



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

**ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΡΜΠΟΪΩΝ USUTU  
ΚΑΙ TOSCANA ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟΥ ΥΓΡΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

---

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΠΛΕΤΣΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, ΚΥΡΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ, ΕΙΕ**

**ΧΑΤΖΗΘΕΟΔΩΡΟΥ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ  
Α.Μ.: 00044**

**ΑΘΗΝΑ, 2019**



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND  
BIOTECHNOLOGY

NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION  
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERINSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES  
IN  
BIOENTREPRENEURSHIP**



**MASTER THESIS**

---

**RETROSPECTIVE STUDY FOR THE PRESENCE OF ARBOVIRUSES  
USUTU AND TOSCANA IN HUMAN CEREBROSPINAL FLUID  
SAMPLES WITH MOLECULAR METHODS**

---

**SUPERVISOR:** PLETS VASILIKI, SENIOR RESEARCHER, N.H.R.F.

**CHATZITHEODOROU MAGDALINI**  
**Registration Number: 00044**

**ATHENS, 2019**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ υπό την άμεση επίβλεψη της Δρ. Μαίρης Εμμανουήλ, στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

## **ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Εγκρίθηκε την....., από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ</b>	<b>ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
Πλέτσα Βασιλική	Ερευνήτρια Β', ΕΙΕ	
Μπαλατσός Νικόλαος	Επίκουρος Καθηγητής, Παν/μιο Θεσσαλίας	
Άννα – Μαρία Ψαρρά	Επίκουρη Καθηγήτρια, Παν/μιο Θεσσαλίας	

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά την άμεση επιβλέπουσα Δρ. Μαίρη Εμμανουήλ, ΕΛΕ Β΄ του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, για την άψογη συνεργασία μας, τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και για την καθοδήγηση και στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ευχαριστώ επίσης θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Βασιλική Πλέτσα, Ερευνήτρια Β΄ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω το παρόν μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, καθώς και για την αμέριστη υποστήριξή της τα τελευταία δύο χρόνια.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Ερευνών του Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Δρ. Ανδρέα Μεντή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ με το εργαστήριο του Τμήματος Διάγνωσης, καθώς και για τη μεγάλη εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά το διάστημα παραμονής μου στο Ινστιτούτο. Συνάμα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Διευθυντή Ερευνών του Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας, Δρ. Διονύσιο Σγούρα, που με έφερε σε επαφή με τον Δρ. Α. Μεντή και τη Δρ. Μ. Εμμανουήλ, κάνοντας έτσι αυτή τη συνεργασία εφικτή.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που στελεχώνουν το Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, τόσο για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή τους στην εκπόνηση αυτής της εργασίας, όσο και για το ζεστό και φιλικό κλίμα που δημιουργούσαν καθημερινά στο εργαστήριο. Ειδικότερα, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στη Μαρία Κουτσουμπίδου, τη Δρ. Μαρία Ευαγγελίδου, τη Δρ. Άντα Βούλγαρη-Κόκοτα, τη Δρ. Beatriz Martinez-Gonzalez, τη Δρ. Ελίνα Χορευτή, τον Δρ. Αθανάσιο Κοσσυβάκη, τον Αντώνη Καλλιαρόπουλο, τη Δρ. Ιουλία Καραγεώργου, τη Βούλα Λαμπροπούλου, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Γιάννη Καραγιάννη και Λευτέρη Κοντιζά, για τη στήριξη και την καθοδήγησή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους δικούς μου ανθρώπους και την οικογένειά μου, και ιδιαίτερα τους γονείς μου, Νίκο και Αγγελική, για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση και υποστήριξή τους, καθ' όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

## Πίνακας Περιεχομένων

1	<b>Εισαγωγή</b>	Σελ. 8
1.1	<b>Ιστορική αναδρομή και γενικά στοιχεία για τους ιούς</b>	Σελ. 8
1.1.1	Η ανακάλυψη των ιών	Σελ. 8
1.1.2	Οι πρώτες οπτικές παρατηρήσεις και χημικές αναλύσεις	Σελ. 9
1.1.3	Ιδιότητες κοινές σε όλους τους ιούς	Σελ. 9
1.1.4	Ο κύκλος πολλαπλασιασμού των ιών	Σελ. 10
1.1.5	Προέλευση των ιών	Σελ. 11
1.2	<b>Ιστορικές επιδημίες και πανδημίες</b>	Σελ. 12
1.3	<b>Πρόληψη και θεραπεία ιϊκών λοιμώξεων</b>	Σελ. 13
1.3.1	Εμβόλια	Σελ. 13
1.3.2	Αντιϊικά φάρμακα	Σελ. 14
1.4	<b>Ταξινόμηση των ιών</b>	Σελ. 15
1.5	<b>Αρμποϊοί</b>	Σελ. 16
1.5.1	Ετυμολογία και ορισμός του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ)	Σελ. 16
1.5.2	Φορείς μετάδοσης των αρμποϊών	Σελ. 17
1.5.3	Παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή και εξάπλωση των αρμποϊών	Σελ. 19
1.5.4	Σημαντικοί ιοί των οικογενειών Flaviviridae και Phenulviridae	Σελ. 21
1.5.4.1	Οικογένεια Flaviviridae	Σελ. 21
1.5.4.2	Οικογένεια Phenulviridae της τάξης Bunyavirales	Σελ. 24
1.5.5	Κλινική εικόνα αρμποϊικών λοιμώξεων	Σελ. 26
1.5.6	Πρόληψη και θεραπεία αρμποϊικών λοιμώξεων	Σελ. 27
1.6	<b>Ιός Usutu</b>	Σελ. 28
1.6.1	Γενικά στοιχεία για την εμφάνιση και την απομόνωση του ιού	Σελ. 28
1.6.2	Φορείς και ξενιστές του USUV	Σελ. 29
1.6.3	Περιοχές που ενδημεί και εμφανίζεται ο USUV	Σελ. 30
1.6.4	Περιστατικά μόλυνσης από USUV σε ανθρώπους	Σελ. 31
1.6.5	Κλινική εικόνα του ιού Usutu	Σελ. 32
1.6.6	Γενικά χαρακτηριστικά και μοριακή δομή του USUV	Σελ. 33
1.6.7	Γενετική ποικιλία και φυλογενετική του USUV	Σελ. 34
1.6.8	Ανίχνευση, διάγνωση και κινητική του USUV	Σελ. 35
1.6.9	Πρόληψη και αντιμετώπιση του USUV	Σελ. 36
1.7	<b>Ιός Toscana</b>	Σελ. 37
1.7.1	Γενικά στοιχεία για την εμφάνιση και την απομόνωση του ιού	Σελ. 37
1.7.2	Φορείς και ξενιστές του TOSV	Σελ. 38
1.7.3	Περιοχές που ενδημεί και εμφανίζεται ο TOSV	Σελ. 39
1.7.4	Περιστατικά μόλυνσης από TOSV σε ανθρώπους	Σελ. 42
1.7.5	Κλινική εικόνα του ιού Toscana	Σελ. 44
1.7.6	Γενικά χαρακτηριστικά και μοριακή δομή του TOSV	Σελ. 45
1.7.7	Γενετική ποικιλία και φυλογενετική του TOSV	Σελ. 48
1.7.8	Ανίχνευση, διάγνωση και κινητική του TOSV	Σελ. 49
1.7.9	Πρόληψη και αντιμετώπιση του TOSV	Σελ. 51
1.8	<b>Διάγνωση ιών</b>	Σελ. 52
1.8.1	Απομόνωση και καλλιέργεια ιών	Σελ. 53
1.8.2	Ορολογικές μέθοδοι διάγνωσης	Σελ. 53
1.8.2.1	Δοκιμή εξουδετέρωσης πλάκας (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT)	Σελ. 54
1.8.2.2	Δοκιμή αιμοσυγκόλλησης και αναστολής αιμοσυγκόλλησης (Hemmagglutination and Hemmagglutination inhibition assay)	Σελ. 54

1.8.2.3	Δοκιμή άμεσου ανοσοφθορισμού (Immunofluorescent Assay, IF)	Σελ. 55
1.8.2.4	Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	Σελ. 55
1.8.3	Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης	Σελ. 56
1.8.3.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	Σελ. 56
1.8.3.2	PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)	Σελ. 57
1.8.3.3	PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR)	Σελ. 58
1.8.3.4	Αλληλούχηση	Σελ. 59
1.8.3.4.1	Αλληλούχηση κατά Sanger	Σελ. 59
1.8.3.4.2	Αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)	Σελ. 60
2	<b>Σκοπός</b>	Σελ. 61
3	<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	Σελ. 61
3.1	Απομόνωση RNA από κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)	Σελ. 61
3.2	Θετικοί μάρτυρες Usutu και Toscana	Σελ. 62
3.3	Δημιουργία βάσης δεδομένων ENY	Σελ. 62
3.4	Αναζήτηση και επιλογή μεθόδων real-time RT-PCR για την ανίχνευση των ιών Usutu και Toscana	Σελ. 63
3.5	Ιικά γονίδια στόχοι των επιλεγμένων μεθόδων real-time RT-PCR	Σελ. 63
3.5.1	Γονίδια στόχοι των μεθόδων για τον ιό Usutu	Σελ. 63
3.5.2	Γονίδια στόχοι των μεθόδων για τον ιό Toscana	Σελ. 64
3.6	Στοίχιση αλληλουχιών ιικών στελεχών με εκκινητές και ιχνηθέτες στην εφαρμογή BioEdit	Σελ. 64
3.7	Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών των μεθόδων real-time RT-PCR	Σελ. 65
3.7.1	Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη της μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Usutu	Σελ. 65
3.7.2	Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη της 1 <sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana	Σελ. 65
3.7.3	Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη της 2 <sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana	Σελ. 66
3.8	Βελτιστοποίηση των μεθόδων real-time RT-PCR	Σελ. 66
3.8.1	Επιλογή κατάλληλων ενζύμων για την κάθε μέθοδο	Σελ. 66
3.8.2	Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιόντων Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> )	Σελ. 67
3.8.3	Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών	Σελ. 68
3.8.4	Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιχνηθετών	Σελ. 68
3.9	Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος - Μάρτυρες για την αξιοπιστία του αποτελέσματος	Σελ. 68
3.10	Κυτταροκαλλιέργειες για ιική ανάπτυξη	Σελ. 69
3.11	Έλεγχος ειδικότητας των μεθόδων real-time RT-PCR	Σελ. 70
4	<b>Αποτελέσματα</b>	Σελ. 71
4.1	Απομόνωση RNA από κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)	Σελ. 71
4.2	Δημιουργία βάσης δεδομένων ENY	Σελ. 71
4.3	Στοίχιση αλληλουχιών ιικών στελεχών με εκκινητές και ιχνηθέτες στην εφαρμογή BioEdit	Σελ. 71
4.4	Βελτιστοποίηση των μεθόδων real-time RT-PCR	Σελ. 74

4.4.1	Επιλογή κατάλληλων ενζύμων για την κάθε μέθοδο	Σελ. 74
4.4.2	Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιόντων $Mg^{2+}$ ( $MgSO_4$ )	Σελ. 76
4.4.3	Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών	Σελ. 77
4.4.4	Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιχνηθετών	Σελ. 79
4.5	Έλεγχος ειδικότητας των μεθόδων real-time RT-PCR	Σελ. 82
4.6	Real-time RT-PCR των κλινικών δειγμάτων ENY	Σελ. 82
5	<b>Συζήτηση</b>	Σελ. 84
6	<b>Βιβλιογραφία</b>	Σελ. 90
	<b>Παράρτημα I: Πειραματικά πρωτόκολλα</b>	Σελ. 95
	Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA από κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)	Σελ. 95
	Τελικά πρωτόκολλα των μεθόδων real-time RT-PCR	Σελ. 96
	Πρωτόκολλο μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Usutu	Σελ. 96
	Πρωτόκολλο 1 <sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana	Σελ. 96
	Πρωτόκολλο 2 <sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana	Σελ. 97
	Πρωτόκολλο εμβολιασμού των ιών στις κυτταρικές σειρές	Σελ. 97
	<b>Παράρτημα II: Αποτελέσματα – Πρόσθετο υλικό</b>	Σελ. 99

## **Περίληψη**

Οι αρμυοϊοί είναι ιοί που χρησιμοποιούν ως κύριους φορείς μετάδοσης τα αρθρόποδα, και περιλαμβάνουν 8 διαφορετικές ιικές οικογένειες. Ο ιός Usutu ανήκει στην αρμυοϊκή οικογένεια Flaviviridae και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1959 στη Νότια Αφρική. Από την εμφάνισή του και μετά, εξαπλώθηκε σταδιακά στην Αφρικανική ήπειρο και αργότερα, ακολούθησε η εισαγωγή και εξαπλώσή του σε Ευρωπαϊκές χώρες. Ο ιός Toscana ανήκει στην αρμυοϊκή οικογένεια Phenuiviridae και απομονώθηκε αρχικά το 1971 στην κεντρική Ιταλία. Το εύρος της γεωγραφικής κατανομής του είναι μεγάλο και περιλαμβάνει τις περισσότερες χώρες της Δυτικής Ευρώπης που βρίσκονται στα βόρεια σύνορα της Μεσογείου, καθώς και χώρες ανατολικά αυτής. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε αναδρομική μελέτη της παρουσίας των αρμυοϊών Usutu και Toscana σε 477 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) ανθρώπων με real-time RT-PCR. Για να γίνει αυτό δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων με όλα τα κλινικά δείγματα ENY που παρέλαβε το Διαγνωστικό τμήμα του Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ τα τελευταία 2,5 έτη, απομονώθηκε RNA από τα κλινικά δείγματα και παράλληλα, αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν εξειδικευμένες μέθοδοι real-time RT-PCR. Οι μέθοδοι επιλέχθηκαν μετά από αξιολόγηση στο λογισμικό BioEdit, και οι συνθήκες που βελτιστοποιήθηκαν ήταν η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$ , η συγκέντρωση των εκκινητών, η συγκέντρωση των ιχνηθετών, καθώς και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν. Για τον έλεγχο της ειδικότητας των μεθόδων, αυτές δοκιμάστηκαν με θετικούς μάρτυρες επτά παθογόνων παραγόντων με παρόμοιο εύρος συμπτωμάτων ή/και τρόπο μετάδοσης και επιβεβαιώθηκε ότι δεν υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με κανένα από αυτούς. Συνολικά, στην αναδρομική μελέτη της παρουσίας των αρμυοϊών Usutu και Toscana δεν εντοπίστηκε κανένα θετικό δείγμα ENY. Ακόμη, συγκρίνοντας τις καμπύλες των αρχικών δοκιμαστικών πειραμάτων real-time RT-PCR των μεθόδων με αυτές που προέκυψαν κατόπιν βελτιστοποίησης, η διαφορά ήταν εμφανής. Συνεπώς, φαίνεται ότι οι δοκιμές βελτιστοποίησης εξασφάλισαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στις μεθόδους ανίχνευσης. Λόγω του σταδιακά επεκτεινόμενου γεωγραφικού εύρους εμφάνισης των ιών Usutu και Toscana, κρίνεται αναγκαία η συνέχεια της συγκεκριμένης επιδημιολογικής μελέτης ώστε να μπορέσουν να προσδιοριστούν καλύτερα οι διακριτοί πληθυσμοί που κυκλοφορούν στη χώρα και να βελτιωθούν περαιτέρω οι μέθοδοι διάγνωσης.

## **Λέξεις Κλειδιά**

Αρμυοϊοί, Usutu, Toscana, real-time RT-PCR, Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό



## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Ιστορική αναδρομή και γενικά στοιχεία για τους ιούς

#### 1.1.1 Η ανακάλυψη των ιών

Παρόλο που σήμερα πολλά είναι γνωστά για τους ιούς, είναι σημαντικό και χρήσιμο να αναλογιστεί κανείς πώς προέκυψε αυτή η γνώση. Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, πριν από 100 περίπου χρόνια δηλαδή, ήταν που διατυπώθηκε πρώτη φορά η θεωρία η οποία υποδείκνυε ότι ασθένειες μπορούν να προκαλούνται από μικρόβια. Μάλιστα, οι παθολόγοι ήταν τότε βέβαιοι ότι θα μπορούσε να βρεθεί ένας υπαίτιος μικροοργανισμός για κάθε μολυσματική ασθένεια. Περαιτέρω, πίστευαν ότι αυτοί οι μολυσματικοί παράγοντες μπορούσαν να παρατηρηθούν με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου, ότι μπορούσαν να καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο και κατόπιν, ότι μπορούσαν να παρακρατηθούν από αυτό με χρήση ειδικών φίλτρων (Dimmock *et al.*, 2016). Τα ειδικά αυτά φίλτρα εφευρέθηκαν το 1884 από τον Γάλλο μικροβιολόγο Charles Chamberland και διέθεταν πόρους συγκεκριμένης διαμέτρου που δεν επέτρεπαν την διέλευση βακτηρίων (Shors, 2016). Ωστόσο, το 1892, ο Dmitry Iwanowski μπόρεσε να αποδείξει ότι ο αιτιώδης παράγοντας μιας μωσαϊκής ασθένειας των φυτών καπνού, που εκδηλωνόταν ως αποχρωματισμός των φύλλων, μπορούσε να περάσει από το φίλτρο βακτηρίων, δεν ήταν ορατός στο μικροσκόπιο και συνάμα, δεν μπορούσε να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο (Dimmock *et al.*, 2016). Αν και ο ίδιος δεν εντυπωσιάστηκε τόσο από αυτή την ανακάλυψη καθώς θεώρησε ότι πρόκειται για κάποια βακτηριακή τοξίνη (Collier & Sussman, 1998), ο Martinus Beijerinck επανέλαβε τα πειράματά του το 1898, και πείστηκε ότι η περίπτωση αυτή αντιπροσωπεύει μια νέα μορφή μολυσματικού παράγοντα. Παρατήρησε ότι ο παράγοντας αυτός πολλαπλασιαζόταν μόνο σε κύτταρα που διαιρούνταν και τον ονόμασε *contagium vivum fluidum* (soluble living germ / υγρό ζωντανό μικρόβιο), αυτό που εμείς γνωρίζουμε σήμερα ως ιό (virus). Την ίδια χρονιά, ο Friedrich Loeffler και ο Paul Frosch κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα όσον αφορά στον αιτιώδη παράγοντα του αφθώδους πυρετού. Επιπλέον, επειδή ο αφθώδης πυρετός μπορούσε να μεταφερθεί από ζώο σε ζώο με μεγάλη αραιώση σε κάθε πέρασμα, ο αιτιώδης παράγοντας θα έπρεπε να μπορεί να αναπαραχθεί, κάτι που απέκλειε το ενδεχόμενο μιας βακτηριακής τοξίνης. Σύντομα ανακαλύφθηκαν ακόμα περισσότεροι ιοί ζώων. Εξίσου σημαντική ήταν και η ανακάλυψη μιας μεγάλης κατηγορίας ιών που μολύνουν βακτήρια και αναπαράγονται σε αυτά, σήμερα γνωστοί ως βακτηριοφάγοι, το 1915 από τον Frederick Twort (Dimmock *et al.*, 2016).

Ο πρώτος ιός που ανακαλύφθηκε και μόλυνε ανθρώπους, ήταν αυτός του Κίτρινου Πυρετού. Από το 1881, υπήρχε μια θεωρία που υποστήριζε ότι τα κουνούπια μεταφέρουν την αιτία αυτής της νόσου. Αυτή η θεωρία αποδείχθηκε το 1900 από τον Walter Reed, ο οποίος ανακάλυψε και τον ιό ένα χρόνο αργότερα. Τελικά, η απομόνωση του ιού πραγματοποιήθηκε από τον Max Theiler το 1932, ο οποίος στη συνέχεια κατάφερε να αναπτύξει ένα επιτυχές εμβόλιο εναντίον της ασθένειας (Barrett & Teuwen, 2009).

### 1.1.2 Οι πρώτες οπτικές παρατηρήσεις και χημικές αναλύσεις

Με την εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το 1931 από τους Γερμανούς μηχανικούς Ernst Ruska και Max Knoll, έγινε για πρώτη φορά δυνατή η οπτική παρατήρηση των ιών. Φάνηκε ότι τα σωματίδια των μολυσματικών αυτών παραγόντων μπορούν να έχουν ιδιαίτερα πολύπλοκες δομές. Ακόμη, με τη βοήθεια αυτού του νέου μικροσκοπίου προσδιορίστηκαν τα μεγέθη των ιϊκών σωματιδίων. Οι ιοί αναμενόταν να είναι μικροί, αλλά το εύρος των μεγεθών που παρατηρήθηκαν αποτέλεσε μεγάλη έκπληξη. Ορισμένοι ιοί ήταν ελάχιστα μικρότεροι από τα μικρότερα γνωστά βακτήρια ενώ άλλοι, είχαν παρόμοια μεγέθη με πολύπλοκα οργανικά μόρια (Car & Kelly, 1984). Ο πρώτος ιός που απομονώθηκε και έπειτα καθαρίστηκε ήταν το 1933 από τον Schlessinger, ο οποίος για να το καταφέρει χρησιμοποίησε διαφορική φυγοκέντρηση. Η χημική ανάλυση του καθαρισμένου ιού, και πιο συγκεκριμένα βακτηριοφάγου, έδειξε ότι συνίστατο από περίπου ίσες αναλογίες πρωτεΐνης και δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) (Dimmock *et al.*, 2016). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1935, ο Wendell Meredith Stanley απομόνωσε τον ιό της μωσαϊκής ασθένειας του καπνού σε παρακρυσταλλική μορφή (Fenner, 2008) και το 1937, οι Bawden και Pirie κατάφεραν να καθαρίσουν πολύ πιο εκτεταμένα τον ιό αυτό, δείχνοντας ότι πρόκειται για μια νουκλεοπρωτεΐνη που περιέχει ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Έτσι πλέον ήταν γνωστό ότι τα σωματίδια του ιού μπορεί να περιέχουν είτε DNA, είτε RNA. Ωστόσο, είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη ότι, εκείνη τη χρονική στιγμή δεν ήταν γνωστό πως τα νουκλεϊκά οξέα αποτελούν το γενετικό υλικό των οργανισμών (Dimmock *et al.*, 2016).

### 1.1.3 Ιδιότητες κοινές σε όλους τους ιούς

Σε σύγκριση με το γονιδίωμα των κυττάρων, τα ιϊκά γονιδιώματα είναι μικρά και κυμαίνονται σε μέγεθος ανάλογα με τον ιό (περίπου από 3000 nt έως 1.200.000 bp). Τα γονιδιώματα αυτά κουβαλούν πληροφορίες για πρωτεΐνες που στην απλούστερη

περίπτωση σχηματίζουν το σωματίδιο του ιού, ενώ σε ορισμένους ιούς αυτό το σώμα νουκλεοπρωτεΐνης περιβάλλεται από περαιτέρω πρωτεϊνικά μόρια ή λιπιδική διπλοστοιβάδα. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των ιών είναι ότι μπορούν να αναπαραχθούν μόνο σε ζωντανά κύτταρα. Το εξωτερικό στρώμα πρωτεϊνών του σωματιδίου του ιού επιτρέπει σε αυτόν να αναγνωρίσει το σωστό κύτταρο ξενιστή και έπειτα να αποκτήσει πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα του (Dimmock *et al.*, 2016).

#### 1.1.4 Ο κύκλος πολλαπλασιασμού των ιών

Σήμερα γνωρίζουμε πολλά για τις διαδικασίες που συμβαίνουν κατά τον πολλαπλασιασμό των ιών μέσα σε μεμονωμένα κύτταρα. Μπορεί οι ακριβείς λεπτομέρειες να διαφέρουν ανάμεσα στις διάφορες ιϊκές ομάδες, όμως υπάρχει μια κοινή σειρά γεγονότων που αντιπροσωπεύουν συγκεκριμένες φάσεις στον κύκλο πολλαπλασιασμού των ιών. Το πρώτο στάδιο είναι εκείνο της «προσκόλλησης», κατά το οποίο ο ιός προσδένεται στο δυνητικό κύτταρο ξενιστή. Η αλληλεπίδραση είναι ειδική, καθώς η πρωτεΐνη προσκόλλησης του εκάστοτε ιού δεσμεύει τα μόρια υποδοχέα-στόχου στην επιφάνεια του κυττάρου. Η αρχική επαφή μεταξύ του ιού και του κυττάρου-ξενιστή είναι δυναμική και αναστρέψιμη και συχνά περιλαμβάνει αδύναμες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, σε δεύτερη φάση η επαφή αυτή γίνεται πολύ πιο σταθερή, μέσω πιο σταθερών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ουσιαστικά μη αναστρέψιμες. Αφού συνδεθεί με την επιφάνεια του κυττάρου, ο ιός πρέπει να καταφέρει να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα για να μπορεί να αναπαραχθεί, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται «διείσδυση» ή «είσοδος» (Dimmock *et al.*, 2016). Οι ιοί διεισδύουν στο κύτταρο ξενιστή είτε με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης είτε μέσω σύντηξης με το κύτταρο (Shors, 2016). Μόλις βρεθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, το γονιδίωμα του ιού πρέπει να γίνει άμεσα προσβάσιμο. Αυτό επιτυγχάνεται με την απώλεια πολλών ή όλων των πρωτεϊνών που συνθέτουν το σωματίδιο μέσω μιας διαδικασίας που αναφέρεται ως «αποκάλυψη». Για ορισμένους ιούς οι φάσεις εισόδου και αποκάλυψης συνδυάζονται σε μια ενιαία διαδικασία. Τυπικά, αυτές οι τρεις πρώτες φάσεις δεν απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας υπό μορφή υδρόλυσης ATP. Όντας πλέον διαθέσιμο, το γονιδίωμα του ιού χρησιμοποιείται στη φάση «βιοσύνθεσης» κατά την οποία αναπαράγεται το γονιδίωμα, μεταγράφονται τα μόρια mRNA και μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Η διαδικασία της μετάφρασης χρησιμοποιεί ριβοσώματα που παρέχονται από το κύτταρο ξενιστή. Η εξάρτηση των ιών από το μηχανισμό μετάφρασης και τα μόρια βιοσύνθεσης των ξενιστών, είναι αυτό που τους καθιστά υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα (Dimmock *et al.*, 2016). Στη συνέχεια, τα νεοσυντιθέμενα γονιδιώματα μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για περαιτέρω γύρους αντιγραφής καθώς και μεταγραφής mRNA, σε μια διαδικασία ενίσχυσης η οποία αυξάνει την απόδοση ιού από τα μολυσμένα κύτταρα. Το στάδιο που ακολουθεί είναι αυτό της «συναρμολόγησης» όπου οι νεοσχηματισθείσες ιϊκές πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα συνδυάζονται για να σχηματίσουν εκατοντάδες νέα σωματίδια του ιού (Shors, 2016). Τέλος, στο στάδιο «απελευθέρωσης», τα σωματίδια εγκαταλείπουν το κύτταρο και ύστερα αναζητούν νέα πιθανά κύτταρα ξενιστές για να ξεκινήσουν ξανά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού από το πρώτο στάδιο. Τα ιϊκά σωματίδια που παράγονται μέσα στο κύτταρο μπορεί να απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία προκειμένου να γίνουν μολυσματικά και αυτή η φάση ωρίμανσης μπορεί να συμβεί είτε πριν, είτε μετά την απελευθέρωση (Dimmock *et al.*, 2016).

#### 1.1.5 Προέλευση των ιών

Το ζήτημα της προέλευσης των ιών είναι ένα συναρπαστικό θέμα, αλλά όπως συνηθίζεται όταν δεν υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία και αποδείξεις, οι απόψεις διίστανται και οι συζητήσεις είναι αρκετά έντονες. Υπάρχουν δύο δημοφιλείς θεωρίες. Η πρώτη στηρίζει ότι οι ιοί είναι εκφυλισμένα κύτταρα, δηλαδή μικρά κύτταρα που παρασιτούσαν σε μεγαλύτερα και με την πάροδο των χρόνων τα γονίδια που δεν χρειαζόνταν λόγω παρασιτισμού εξαφανίστηκαν, μαζί με την ικανότητα επιβίωσης χωρίς τον ξενιστή. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι ορισμένοι ιοί μπορεί να εξελίχθηκαν από κομμάτια DNA ή RNA που διέφυγαν από το γονιδίωμα ενός μεγαλύτερου οργανισμού (Wilson & Miles, 1975; Dimmock *et al.*, 2016). Παρά τις δεκαετίες συζήτησης, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις εάν κάποια από τις δύο ή και οι δύο θεωρίες είναι σωστές. Σίγουρα είναι δύσκολο όλοι οι ιοί να έχουν εξελιχθεί από ένα μόνο πρόγονο. Πιθανότατα έχουν «προκύψει» πολλές φορές στο παρελθόν με τον έναν ή και με τους δύο αυτούς τρόπους. Το βέβαιο είναι ότι μόλις δημιουργηθούν, υπόκεινται σε εξελικτικές πιέσεις, όπως και όλοι οι άλλοι οργανισμοί, και αυτό έχει οδηγήσει στην εξαιρετική ποικιλομορφία των ιών που υπάρχουν σήμερα. Ακόμη, η ταχεία αλληλούχηση ολοένα και περισσότερων ιϊκών καθώς και κυτταρικών γονιδιωμάτων παρέχει συνεχώς χρήσιμα δεδομένα για την καλύτερη κατανόηση της φυλογενετικής προέλευσης των διαφόρων ιών. Ωστόσο, παρόλο που τέτοιες αναλύσεις μπορούν να εντοπίσουν τους προγόνους ενός ιού, ούτε αυτές μπορούν να αποφασίσουν μεταξύ της θεωρίας «εκφυλισμού» και «διαφυγής» (Dimmock *et al.*, 2016).

## 1.2 Ιστορικές επιδημίες και πανδημίες

Οι άνθρωποι μάχονται τους ιούς από τότε που το είδος μας δεν είχε εξελιχθεί ακόμη στη σύγχρονη μορφή του. Με τον όρο επιδημία εννοούμε την εξάπλωση ενός ιού μια δεδομένη χρονική περίοδο, σε βαθμό μεγαλύτερο του αναμενόμενου και με αυξημένα κρούσματα ασθενειών. Μια επιδημία μπορεί να περιορίζεται γεωγραφικά σε έναν τόπο ή μια ολόκληρη χώρα. Στην περίπτωση που η επιδημία εξαπλωθεί και εκτός των γεωγραφικών ορίων μιας χώρας, χαρακτηρίζεται ως πανδημία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ιών που έχουν οδηγήσει σε ιστορικές επιδημίες και πανδημίες περιγράφονται παρακάτω.

Ο ιός της ευλογιάς ήταν μια σημαντική αιτία θανάτου τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, σκοτώνοντας περίπου 300 εκατομμύρια ανθρώπους. Έχει πιθανώς σκοτώσει περισσότερους ανθρώπους από οποιονδήποτε άλλο ιό. Το 1966, η Παγκόσμια Συνέλευση Υγείας συμφώνησε να ξεκινήσει ένα «εντατικό πρόγραμμα εξάλειψης της ευλογιάς», όπου εκείνη την εποχή παρέμενε ενδημική σε 31 χώρες, και να προσπαθήσει να εξαλείψει την ασθένεια εντός δέκα ετών. Μετά από 13 χρόνια συντονισμένης παρακολούθησης της νόσου και εκστρατειών εμβολιασμού σε ολόκληρο τον κόσμο, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κήρυξε ότι η ευλογιά είχε πλέον εξαλειφθεί το 1979 (Glynn & Glynn, 2004).

Η ιλαρά προσβάλλει περίπου 20 εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως, κυρίως στις αναπτυσσόμενες περιοχές της Αφρικής και της Ασίας. Αν και συχνά θεωρείται παιδική ασθένεια, μπορεί να επηρεάσει ανθρώπους οποιασδήποτε ηλικίας. Το 1980, ήταν η αιτία για το θάνατο 2,6 εκατομμύρια ανθρώπων ενώ το 2014 τα παγκόσμια προγράμματα εμβολιασμού είχαν μειώσει τον αριθμό των θανάτων από ιλαρά σε 73.000 (Oldstone, 2009). Παρά τις τάσεις αυτές, τα ποσοστά ασθενών, καθώς και των θανάτων, άρχισαν να αυξάνονται πολύ από το 2017 έως το 2019 εξαιτίας μειωμένης ανοσοποίησης.

Εξίσου σημαντικός είναι και ο ιός της πολιομυελίτιδας ή αλλιώς της «παιδικής παράλυσης». Το 1916 υπήρξε μια μεγάλη επιδημία στην Αμερική, όπου καταγράφηκαν 27.000 περιπτώσεις και 6.000 θάνατοι (Shors, 2016). Τη δεκαετία του 1950 εμφανίζονταν 60.000 περιπτώσεις κάθε χρόνο μόνο στην Αμερική και κατά μέσο όρο 2.300 στην Αγγλία και την Ουαλία. Μετά την ανάπτυξη εμβολίων στα μέσα της δεκαετίας του '50 και ακόλουθες εκστρατείες μαζικού εμβολιασμού σε πολλές χώρες, ο ετήσιος αριθμός περιπτώσεων πολιομυελίτιδας μειώθηκε δραματικά (Oldstone, 2009).

Η γρίπη είναι μια ακόμα πολύ σημαντική μολυσματική ασθένεια που προκαλείται από έναν ιό. Τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, σημειώθηκαν τρεις πανδημίες. Η ισπανική

γρίπη το 1918 σκότωσε περίπου 50 εκατομμύρια ανθρώπους και θεωρείται μία από τις χειρότερες φυσικές καταστροφές στην ιστορία. Η ασιατική γρίπη το 1957 προκάλεσε δύο εκατομμύρια θανάτους και τέλος η γρίπη του Χονγκ Κονγκ το 1968 γύρω στο ένα εκατομμύριο. Πιο πρόσφατα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κήρυξε νέα πανδημία τον Ιούνιο του 2009. Πλέον η γρίπη εξαπλώνεται σε όλο τον κόσμο σε ετήσια βάση, με αποτέλεσμα περίπου 3 έως 5 εκατομμύρια κρούσματα σοβαρών ασθενειών και περίπου 250.000 με 500.000 θανάτους. Περίπου το 20% των μη εμβολιασμένων παιδιών και το 10% των μη εμβολιασμένων ενηλίκων δυστυχώς μολύνονται κάθε χρόνο (Shors, 2016).

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), που είναι κυρίως σεξουαλικά μεταδιδόμενος, μπορεί να προκαλέσει AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome, Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας) και έχει μεγάλη επίδραση στην κοινωνία, τόσο ως ασθένεια όσο και ως πηγή διακρίσεων. Από τη στιγμή που εντοπίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980, η ασθένεια έχει προκαλέσει πάνω από 35 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως και ο ιός θεωρείται πανδημικός. Δυστυχώς δεν υπάρχει κάποια θεραπεία πλήρους ίασης ή εμβόλιο, παρόλα αυτά η αντιρετροϊκή θεραπεία μπορεί να επιβραδύνει την πορεία της νόσου και μπορεί να χαρίσει στον ασθενή ένα σχεδόν φυσιολογικό προσδόκιμο ζωής (Shors, 2016).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου, ένας φλαβοϊός, αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1937. Η μεγαλύτερη επιδημία συνέβη το 1974 στη Νότια Αφρική, όπου αρρώστησαν 10.000 άνθρωποι. Η συχνότητα των επιδημιών άρχισε να αυξάνεται το 1996, κυρίως γύρω από την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, και μέχρι το 1999 ο ιός είχε φτάσει στην Αμερική. Από τότε έχουν εμφανιστεί πολλά ακόμη κρούσματα στην Ευρώπη. Δεν υπάρχουν εμβόλια για την πρόληψη ή φάρμακα για τη θεραπεία του ιού και περίπου 1 στα 150 μολυσμένα άτομα αναπτύσσουν σοβαρά συμπτώματα, τα οποία μερικές φορές οδηγούν και στον θάνατο (Petersen *et al*, 2013).

### **1.3 Πρόληψη και θεραπεία ιϊκών λοιμώξεων**

#### **1.3.1 Εμβόλια**

Αν και αναφορές για διάφορες μεθόδους πρόληψης ασθενειών είχαν ξεκινήσει από το 1000 μ.Χ., κυρίως στην Ανατολή, το πρώτο εμβόλιο που αναφέρεται στην Ιστορία της Ιατρικής αναπτύχθηκε πολύ αργότερα, μετά από παρατηρήσεις δεκαετιών, και στόχευε τον ιό της ευλογιάς. Το 1796 ο Edward Jenner παρατήρησε ότι οι γυναίκες που άρμεγαν τις αγελάδες παρουσίαζαν φυσαλίδες στα χέρια τους και δεν νοσούσαν

από ευλογιά. Ο Jenner χρησιμοποίησε το υγρό από τις φυσαλίδες αυτές και εμβολίασε ένα οκτάχρονο αγόρι τον James Phipps. Ο James, όταν ήρθε σε επαφή με άτομα που έπασχαν από ευλογιά, δε νόσησε κι έτσι το πρώτο εμβόλιο ήταν γεγονός. Αξίζει να αναφέρουμε ότι η λέξη vaccine προέρχεται από την λατινική λέξη vacca που σημαίνει αγελάδα. Αργότερα ο Pasteur χρησιμοποίησε την λέξη vaccine για όλα τα εμβόλια (Gross & Sepkowitz, 1998).

Οι άνθρωποι ανέκαθεν ανησυχούσαν για την προστασία τους από ασθένειες που οφείλονται σε ιικές λοιμώξεις. Ιστορικά, η ανοσοποίηση με εμβόλια ήταν πολύ πιο αποτελεσματική από τη χρήση αντιϊκών θεραπευτικών ουσιών. Αυτό είναι κάτι που φαίνεται να αλλάζει καθώς αρχίζουν να κυκλοφορούν ολοένα και περισσότερα βελτιωμένα και πιο εξειδικευμένα αντιϊκά φάρμακα. Παρόλα αυτά, προς το παρόν η καλύτερη επιλογή εξακολουθεί να είναι η αποφυγή της μόλυνσης με τον εμβολιασμό. Το σκεπτικό πίσω από τον εμβολιασμό είναι η ενίσχυση της ειδικής ανοσίας για τον ιό χωρίς το άτομο να χρειαστεί να βιώσει την ασθένεια. Δυστυχώς για πολλούς ιούς δεν υπάρχει ακόμη διαθέσιμο εμβόλιο παρά τα χρόνια προσπαθειών και ερευνών, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις εμβολίων που ακόμη χρήζουν βελτιστοποίησης (Dimmock *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Αντιϊκά φάρμακα

Από την επιτυχή χρήση αντιβιοτικών ουσιών τη δεκαετία του 1940 για τον έλεγχο των βακτηριακών λοιμώξεων, γεννήθηκε η ελπίδα ότι θα μπορούσαν να βρεθούν παρόμοιες θεραπείες για λοιμώξεις από ιούς, τα «αντιϊκά». Η ελπίδα αυτή έγινε όμως πραγματικότητα 50 χρόνια αργότερα. Σήμερα έχουν εγκριθεί περισσότερα από 40 αντιϊκά φάρμακα για ανθρώπινη χρήση, τα μισά εκ των οποίων είναι ειδικά για το AIDS. Τα περισσότερα αντιϊκά είναι ειδικά για έναν ή λίγους ιούς και δεν έχουν δράση ευρέος φάσματος όπως τα αντιβιοτικά (Dimmock *et al.*, 2016).

Σε γενικές γραμμές τα αντιϊκά φάρμακα αντιμετωπίζουν δύο βασικές δυσκολίες. Αρχικά, υπάρχει το πρόβλημα ότι μέχρι να εμφανιστούν τα κλινικά συμπτώματα, η αναπαραγωγή του ιού έχει φτάσει σε τέτοιο ύψος ώστε το αντιϊκό φάρμακο δεν έχει πια θεραπευτικό αποτέλεσμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην περίπτωση μιας αναμενόμενης επιδημίας, ίσως είναι καλύτερο τα αντιϊκά φάρμακα να χορηγούνται στους ανθρώπους προτού αυτοί μολυνθούν, δηλαδή να χρησιμοποιούνται σαν προφυλακτικό και προληπτικό μέτρο. Το άλλο πρόβλημα είναι ότι, ο πολλαπλασιασμός του ιού συνδέεται τόσο στενά με τις κυτταρικές διεργασίες που τα περισσότερα αντιϊκά δεν μπορούν να διακρίνουν μεταξύ μολυσμένων και υγιών κυττάρων, και έτσι είναι τοξικά. Ωστόσο, καθώς οι ιοί έχουν μοναδικά

χαρακτηριστικά, μορφολογικά και μη, είναι πιο αποτελεσματικό όταν ένα αντιϊικό φάρμακό στοχεύει σε αυτά και κατ' επέκταση δρα πολύ πιο εξειδικευμένα. Να σημειωθεί πως ένα εν δυνάμει αντιϊικό φάρμακο θα μπορούσε να αναστείλει οποιοδήποτε στάδιο του κύκλου πολλαπλασιασμού ενός ιού, όπως αυτό της προσκόλλησης, της αντιγραφής, της μεταγραφής, της μετάφρασης, της συναρμολόγησης ή και της απελευθέρωσης των νέων ιϊκών σωματιδίων. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι σχεδόν όλα τα υπάρχοντα αντιϊικά φάρμακα δρουν μόνο ενάντια σε ιούς που αντιγράφονται και δεν είναι αποτελεσματικά ενάντια σε λανθάνουσες λοιμώξεις. Έτσι, για παράδειγμα, τα φάρμακα κατά του AIDS δεν καθαρίζουν τον ιό από το σώμα και πρέπει να λαμβάνονται εφ' όρου ζωής από τους οροθετικούς προκειμένου να διατηρηθεί η καταστολή του ιού και να αποφευχθεί η βλάβη του ανοσοποιητικού συστήματος (Dimmock *et al.*, 2016).

Δεν πρέπει να ξεχνάμε όμως ότι, ο έλεγχος των ιϊκών ασθενειών μέσω της βελτίωσης των συνθηκών υγιεινής, της εκπαίδευσης και της διαχείρισης της μετάδοσης των μολυσματικών παραγόντων, είναι επίσης μια πτυχή ζωτικής σημασίας για την πρόληψη, ιδίως στις αναπτυσσόμενες περιοχές του πλανήτη (Dimmock *et al.*, 2016).

#### **1.4 Ταξινόμηση των Ιών**

Η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), που ιδρύθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1960, θέσπισε το σύστημα ταξινόμησης για τους ιούς που χρησιμοποιείται και σήμερα. Βασίζεται σε κομμάτια του γνωστού συστήματος ταξινόμησης των οργανισμών και συγκεκριμένα, αυτά της Τάξης, της Οικογένειας, της Υποοικογένειας, του Γένους και του Είδους. Ωστόσο, η έννοια ενός είδους στην ταξινόμηση των ιών είναι πολύπλοκη και σε πολλές περιπτώσεις παραμένει ένα σημείο διαρκούς συζήτησης. Για τους ιούς με γονιδιώματα RNA, η έννοια ενός είδους καθίσταται δύσκολη λόγω της απουσίας κάποιου μηχανισμού διόρθωσης κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος. Το αποτέλεσμα είναι ότι, ένας ιός μπορεί να είναι μέλος ενός πληθυσμού (quasispecies), κάθε μέλος του οποίου μπορεί να έχει διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του γονιδιώματος, χωρίς να υπάρχει μια καθορισμένη "σωστή" αλληλουχία (Dimmock *et al.*, 2016).

Προκειμένου να καταχωρηθεί ένας ιός σε μια ταξινομική ομάδα, η επιτροπή λαμβάνει υπόψη μια σειρά χαρακτηριστικών. Αυτά περιλαμβάνουν το εύρος των ξενιστών του εκάστοτε ιού (ευκαρυώτες ή προκαρυώτες, ζώα, φυτά, κλπ.), τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του (ύπαρξη ελύτρου, σχήμα καψιδίου ή νουκλεοκαψιδίου, κλπ.) και τη φύση του νουκλεϊκού οξέος που αποτελεί το γονιδίωμα του (DNA ή RNA, μονόκλωνο ή δίκλωνο, θετικό ή αρνητικό, κλπ.). Εκτός από αυτές τις



βασικές παραμέτρους λαμβάνονται υπόψη και κάποια επιπρόσθετα χαρακτηριστικά όπως η παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων γονιδίων στα γονιδιώματα «παρόμοιων» ιών. Όλα αυτά τα στοιχεία μαζί επιτρέπουν τον σωστό ταξινομικό προσδιορισμό και την κατανομή υποδιαιρέσεων στις διάφορες ομάδες. Μάλιστα, με τη χρήση της αλληλούχησης ιϊκών γονιδιωμάτων είναι πλέον δυνατή και πιο εύκολη η δημιουργία φυλογενετικών δένδρων με βάση το βαθμό συντήρησης συγκεκριμένων γονιδιακών αλληλουχιών. Η φυλογένεση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν εξετάζουμε πρόσφατα ανακαλυφθέντες ιούς για τους οποίους μπορεί να μην υπάρχουν ακόμα πολλές άλλες πληροφορίες. Γενικότερα, η ταξινόμηση των ιών είναι ένα διαρκές έργο αφού νέοι ιοί ανακαλύπτονται συνεχώς. Καθώς η κατανόησή μας για συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μεγαλώνει, ιδιαίτερα στον τομέα της φυλογενετικής ανάλυσης, οι ταξινομικές ομάδες αναγκαστικά επαναξιολογούνται και επαναπροσδιορίζονται συχνά (Dimmock *et al.*, 2016).

## **1.5 Αρμποϊοί**

### **1.5.1 Ετυμολογία και ορισμός του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ)**

Οι αρμποϊοί είναι ιοί που χρησιμοποιούν ως κύριους φορείς μετάδοσης τα αρθρόποδα, κάτι που τους έχει χάρισει και το όνομά τους (Cleton *et al.*, 2012). Η λέξη αρμποϊός («αρμπο» + «ιός»), προέρχεται από την αγγλική λέξη «Arbovirus» η οποία, όπως είναι προφανές, βγαίνει από τα συνθετικά «arbo» και «virus». Το πρώτο συνθετικό βγαίνει από το χαρακτηρισμό «Arthropod-Borne», δηλαδή που «φέρεται από αρθρόποδα». Ο ορισμός του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για τους αρμποϊούς είναι ο εξής: “Ιοί που διατηρούνται στη φύση κυρίως, ή σε σημαντικό βαθμό, μέσω βιολογικής μετάδοσης σε ευπαθή σπονδυλωτά ξενιστές από αιματοφάγα αρθρόποδα ή μέσω κάθετης και πιθανώς αφροδίσιας μετάδοσης σε αρθρόποδα.” Η ύπαρξη των αρμποϊών δεν ήταν γνωστή μέχρι την άνοδο της σύγχρονης ιατρικής στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, ενώ η σύνδεση μεταξύ των αρθροπόδων και των διάφορων ασθενειών δεν υπήρχε μέχρι το 1881. Τότε ήταν που για πρώτη φορά ο κουβανός γιατρός και επιστήμονας Carlos Finlay πρότεινε ότι ο κίτρινος πυρετός μπορεί να μεταδοθεί από τα κουνούπια αντί της ανθρώπινης επαφής, μια πραγματικότητα που επαληθεύτηκε από τον Major Walter Reed το 1901 (Dimmock *et al.*, 2016).

Στους αρμποϊούς περιλαμβάνεται μια ευρεία ποικιλία ταξινομικών ομάδων RNA ιών. Συγκεκριμένα, οι γνωστοί σήμερα αρμποϊοί προέρχονται από τις εξής 8 διαφορετικές ιϊκές οικογένειες: Flaviviridae, Bunyaviridae, Nairoviridae, Phenuiviridae, Togaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae και Orthomyxoviridae (Weaver & Reisen,

2010). Η πλειοψηφία των αρμποιών ανήκει στις πέντε πρώτες οικογένειες που αναφέρθηκαν μόλις, με τις άλλες τρεις να περιλαμβάνουν σημαντικά λιγότερους αρμποιούς (Cleton *et al.*, 2012) (Εικόνα 1). Να σημειωθεί πως από το 2018, σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών, τα γένη Bunyavirus, Naionivirus και Phlebovirus της οικογένειας Bunyaviridae, ανήχθηκαν στις οικογένειες Bunyaviridae, Naioniridae, Phenuviridae αντίστοιχα και ενσωματώθηκαν μαζί με άλλες οικογένειες στην ευρύτερη τάξη Bunyavirales. Αυτές οι ομάδες RNA ιών έχουν μια ποικιλία τύπων γονιδιωμάτων RNA και στρατηγικών αντιγραφής, υποδηλώνοντας ότι η μέθοδος μετάδοσης μέσω των αρθρόποδων έχει προκύψει πολλές φορές κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους. Ο μόνος γνωστός DNA αρμποιός είναι αυτός της αφρικανικής πανώλης των χοίρων, της οικογένειας Asfarviridae και του γένους Asfarvirus. Η έλλειψη DNA αρμποιών υποδηλώνει ότι η μεγαλύτερη γενετική πλαστικότητα και ο υψηλότερος ρυθμός μετάλλαξης που εμφανίζονται στους ιούς RNA, τους επιτρέπουν να υιοθετήσουν έναν κύκλο εναλλασσόμενου αναδιπλασιασμού σε διαφορετικούς ξενιστές σπονδυλωτών και ασπόνδυλων (Weaver & Reisen, 2010).

Εικόνα 1: Παγκόσμια κατανομή σημαντικών νευροδισιδυτικών αρμποιών (Cleton *et al.*, 2012)

#### 1.5.2 Φορείς μετάδοσης των αρμποιών

Τα κουνούπια, οι σκνίπες και τα τσιμπούρια είναι τα πιο γνωστά αρθρόποδα που μεταδίδουν τους ιούς αυτούς. Σήμερα υπάρχουν πάνω από 545 είδη ύποπτων αρμποιών εκ των οποίων, τεκμηριωμένα, περισσότερα από 150 μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες στους ανθρώπους, με την πλειοψηφία να είναι ζωνοτικές. Οι

ιοί αυτοί διατηρούνται σε έναν κύκλο μετάδοσης μεταξύ αρθροπόδων ως φορέων και σπονδυλωτών ζώων ως δεξαμενές (reservoirs) αλλά και ως κύριους ενισχυτικούς ξενιστές (amplifying hosts) (Cleton *et al.*, 2012). Εξ ορισμού, όταν οι αρμφοϊοί μεταδίδονται βιολογικά, πρέπει προηγουμένως να αναπαράγονται στους αρθρόποδους φορείς τους. Αντίθετα, στην περίπτωση μηχανικής μετάδοσής τους μέσω μολυσμένων προβοσκίδων ή στομάτων αυτό δεν είναι απαραίτητο. Η βιολογική μετάδοση μπορεί να είναι κατακόρυφη, κάτι που περιλαμβάνει τη διέλευση του ιού από ένα μολυσμένο θηλυκό φορέα σε αρσενικούς και θηλυκούς απογόνους. Η οριζόντια βιολογική μετάδοση μπορεί να είναι αφροδίσια, από ένα κατακόρυφα μολυσμένο αρσενικό απευθείας σε ένα θηλυκό φορέα, καθώς και από το στόμα ενός αρθρόποδου φορέα σε ένα σπονδυλωτό ξενιστή, μέσω του σάλιου κατά τη διάρκεια της σίτισης του πρώτου. Ο τελευταίος οριζόντιος τρόπος μετάδοσης είναι συνηθέστερος για την πλειοψηφία των αρμφοϊών και περιλαμβάνει μόλυνση της διατροφικής οδού του φορέα μέσω της σίτισής του με το αίμα μολυσμένου σπονδυλωτού ζώου. Ακολουθεί η διάδοση του ιού στον αρθρόποδο φορέα και ο ενδεχόμενος πολλαπλασιασμός του στους σιελογόνους αδένες αυτού. Ο κύκλος μετάδοσης συνεχίζεται με την έγχυση μολυσματικού σιέλου κατά τη διάρκεια της επόμενης σίτισης του φορέα από άλλο ζώο (Weaver & Reisen, 2010). Οι άνθρωποι μπορούν να μολυνθούν σε περιπτώσεις γεγονότων διάχυσης και μάλιστα, είναι συχνά «αδιέξοδοι» ξενιστές (dead-end hosts). Αυτό επειδή δεν αναπτύσσουν τις απαιτούμενες υψηλές ιαιμίες προκειμένου να μολύνουν οι ίδιοι με τη σειρά τους αρθρόποδα (Cleton *et al.*, 2012). Παρόλο, λοιπόν, που δεν παίζουν ρόλο στην διατήρηση και τον κύκλο μετάδοσης των ιών, η λοίμωξη των ανθρώπων εξακολουθεί να είναι ένα πολύ σημαντικό γεγονός καθώς επιφέρει σε αυτούς τις δυσάρεστες συνέπειες ασθενειών ή και το θάνατο (Braack *et al.*, 2018). Μόνο μερικοί ιοί όπως ο ιός του Κίτρινου Πυρετού, ο Chikungunya και ο ιός του Δάγκειου Πυρετού διαθέτουν ένα μεγαλύτερο εύρος ξενιστών που περιλαμβάνει τους ανθρώπους ως ενισχυτικούς ξενιστές. Η «επιτυχία» των ιών αυτών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο ότι μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία εστιών ασθενειών μέσω κουνουπιών και άλλων αρθρόποδων, συχνά σε αστικές περιοχές, χωρίς την ανάγκη μιας δεξαμενής ζώων. Κλείνοντας, αξίζει να αναφερθεί ένας τρόπος οριζόντιας μετάδοσης που δεν συναντάται στη φύση και που πραγματοποιείται μέσω του αίματος μολυσμένων ανθρώπων. Πρόκειται για τις περιπτώσεις μεταγίσεων αίματος και μεταμόσχευσης οργάνων, γεγονός που προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία και χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, ειδικά σε ενδημικές περιοχές ιών (Cleton *et al.*, 2012).

### 1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή και εξάπλωση των αρμποιών

Με βάση τον τρόπο εμφάνισης και εξάπλωσης, οι ιοί χαρακτηρίζονται ως ενδημικοί όταν διατηρούν μια σταθερή παρουσία σε έναν ορισμένο τόπο και προσβάλουν έναν περιορισμένο αριθμό ατόμων, ως σποραδικοί όταν μιλάμε για περιπτώσεις απομονωμένων λοιμώξεων ή ως επιδημικοί, όταν μιλάμε για εμφάνιση σε μια δεδομένη χρονική περίοδο, σε βαθμό μεγαλύτερο του αναμενόμενου και με αυξημένα κρούσματα ασθενειών. Μεγάλες επιδημίες μπορεί να εμφανιστούν για παράδειγμα λόγω των κλιματικών μεταβολών, όπως οι αναπάντεχες και έντονες βροχοπτώσεις, ή και λόγω της μετακίνησης μεγάλων πληθυσμών ή ιών σε νέες περιοχές (Cleton *et al.*, 2012).

Προκειμένου ένας αρμποιός να εμφανιστεί και να μπορέσει να εξαπλωθεί πρέπει να υπάρχει επαναλαμβανόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ ικανών φορέων και ξενιστών στο κατάλληλο περιβάλλον. Η μετάδοση του ιού σίγουρα μπορεί να περιοριστεί χρονικά ή και χωρικά από την οικολογία του εκάστοτε ξενιστή και του ίδιου του ιού, και μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του. Οι άνθρωποι συνήθως εκτίθενται σε αρμποιούς όταν εισβάλλουν σε ένα αγροτικό περιβάλλον ή όταν φορείς μεταφέρουν τους ιούς αυτούς σε ένα οικιστικό περιβάλλον αντίστοιχα. Συχνά οι αρμποιοί επιτυγχάνουν να παραμείνουν σε χαμηλά επίπεδα συντήρησης μέχρι να πραγματοποιηθεί κάποια αλλαγή σε μεμονωμένους ή πολλαπλούς παράγοντες και να διευκολυνθεί έτσι η ενίσχυση και η ταχεία εξάπλωσή τους (Cleton *et al.*, 2012).

Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η αστικοποίηση. Όσο περισσότεροι άνθρωποι υπάρχουν και όσο πιο πυκνοκατοικημένη είναι μια περιοχή, τόσο περισσότεροι ξενιστές είναι διαθέσιμοι και ευκολότερα προσβάσιμοι στα ανθρωποφιλικά κουνούπια και σε άλλους φορείς αρμποιών, ειδικά σε αστικά περιβάλλοντα. Πρώτες, συνήθως, επηρεάζονται οι πιο φτωχές περιοχές, με κακές συνθήκες υγιεινής και διαβίωσης, και με τα εισοδήματα κάθε νοικοκυριού να μην επιτρέπουν την επαρκή προσωπική προστασία των ανθρώπων από τα κουνούπια. Το 2014, κοντά στο 54% των ανθρώπων ζούσαν σε αστικές περιοχές και οι προβλέψεις είναι ότι μέχρι το 2050, περίπου το 66% του παγκόσμιου πληθυσμού θα κατοικεί σε μεγάλες πόλεις. Οι περισσότεροι πληθυσμοί στην Υποσαχάρια Αφρική αναμένεται να διπλασιαστούν σε μέγεθος, κάτι που αναγκαστικά θα οδηγήσει πολλούς ανθρώπους να μετακινηθούν σε δασικές περιοχές. Ως εκ τούτου θα είναι αναπόφευκτη η έκθεσή τους σε ένα εύρος αρμποιών που υπάρχουν εκεί, οι οποίοι προς το παρόν δεν αποτελούν κίνδυνο. Είναι αυτονόητο ότι αυτές οι πληθυσμιακές αυξήσεις, η αυξανόμενη αστικοποίηση και η αυξημένη διεθνής κυκλοφορία θα παρέχουν πολύ σημαντικές ευκαιρίες για ενίσχυση

της εξάπλωσης και αύξησης των κουνουπιών, και κατ' επέκταση των αρμυριών (Braack *et al.*, 2018).

Επιπρόσθετα, η διακρατική και διηπειρωτική μεταφορά μολυσμένων κουνουπιών και άλλων αρθρόποδων φορέων, ή και των αυγών τους, συγκαταλέγονται στις πιο σημαντικές μεθόδους που οδηγούν σε ταχεία γεωγραφικά άλματα στις κατανομές των αρμυριών. Αυτή η διεθνής εξάπλωση που διευκολύνεται από τους ανθρώπους και τις πράξεις αυτών, έχει ανάγει πολλούς ιούς σε παγκόσμιες απειλές για τη δημόσια υγεία (Braack *et al.*, 2018).

Είναι γεγονός πως οι τουρίστες του δυτικού κόσμου ταξιδεύουν ολοένα και περισσότερο σε εξωτικές τοποθεσίες, οι οποίες βρίσκονται συχνά σε τροπικές ή υποτροπικές περιοχές του πλανήτη (Cleton *et al.*, 2012). Μιλώντας με νούμερα, ο αριθμός των τουριστών που ταξιδεύουν στην Ασία και τον Ειρηνικό αυξήθηκε πάνω από 8% το 2016, με αντίστοιχο ποσοστό να αντιστοιχεί για χώρες της Αφρικής, τις περιοχές δηλαδή με τις μεγαλύτερες δεξαμενές αρμυριών στον κόσμο. Φυσικά οι προβλέψεις είναι ότι οι αυξητικές τάσεις του τουρισμού θα διατηρηθούν και τα επόμενα χρόνια (Braack *et al.*, 2018).

Σημαντικός παράγοντας στη μετάδοση και την εξάπλωση των αρμυριών είναι και η ανάπτυξη του παγκόσμιου εμπορίου η οποία έχει δείξει συνολική αύξηση τα προηγούμενα έτη και αναμένεται να αυξηθεί περισσότερο σύμφωνα με τους οικονομολόγους του Παγκόσμιου Οργανισμού Εμπορίου. Η μεσαία τάξη αναπτύσσεται στις αναδυόμενες οικονομίες της Ασίας, της Αφρικής και της Λατινικής Αμερικής και, καθώς αυξάνεται το διαθέσιμο εισόδημα, τόσο αυξάνεται και η ζήτηση για εισαγόμενα προϊόντα, κάτι που σχετίζεται άμεσα με τη ναυτιλία και το εμπόριο. Κατά την άφιξή τους σε έναν νέο προορισμό, ορισμένοι ιικοί φορείς που έχουν μετακινηθεί με αυτόν τον ανθρωπογενή τρόπο, έχουν δείξει ισχυρή ανταγωνιστική ικανότητα με αποτέλεσμα να εκτοπίζουν τα τοπικά είδη κουνουπιών, να εδραιώνονται και να εξαπλώνονται αντ' αυτών (Braack *et al.*, 2018).

Η μετακίνηση αρμυριών δεν περιορίζεται μόνο στο εμπόριο και τον τουρισμό καθώς υπάρχει ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός ατόμων που ταξιδεύουν για διάφορους ακόμα λόγους. Πολλοί επισκέπτονται φίλους και συγγενείς, άλλοι προσκυνήματα και αρκετοί πάλι ταξιδεύουν για ανθρωπιστικές και άλλες εθελοντικές εργασίες. Δυστυχώς πολύ μεγάλος είναι και ο αριθμός των προσφύγων και των μεταναστών που εκτοπίζονται πολιτικά και οικονομικά από τον τόπο τους, μεταφέροντας έτσι παθογόνους παράγοντες σε άλλες γεωγραφικές περιοχές και μολύνοντας τους εκάστοτε τοπικούς αρθρόποδους φορείς (Braack *et al.*, 2018).

Οι έντονες κλιματικές μετατροπές, όπως η γενικότερη άνοδος της θερμοκρασίας και η υπερθέρμανση του πλανήτη, αναμένεται να συνεχιστούν για το

υπόλοιπο του αιώνα. Οι συνέπειες αυτών των μετατροπών περιλαμβάνουν ευρείες αλλαγές στις μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες, τις βροχοπτώσεις, τις πλημμύρες και τις ξηρασίες και διάφορες άλλες κλιματικές παραμέτρους. Τέτοιες αλλαγές, και σε τόσο μεγάλο γεωγραφικό εύρος, όπως είναι λογικό θα ευνοούν ολοένα και περισσότερο την εξάπλωση και την ευημερία των φορέων των αρμποιών (Braack *et al.*, 2018).

Ενδεχόμενες μεταλλάξεις των ιικών γονιδιωμάτων μπορούν να ενισχύσουν την παθογονικότητα του εκάστοτε ιού (Weaver & Reisen, 2010). Είναι γεγονός πως οι ανακατατάξεις στο ιικό γονιδίωμα είναι ικανές να παράγουν νέους ιούς με διαφορετικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και ενισχυμένη μολυσματικότητα. Ακόμα όμως και σχετικά μικρές μεταλλάξεις είναι ικανές να επηρεάσουν πολύ την ευαισθησία του εκάστοτε ιικού φορέα στον νέο ιό, επιτρέποντας δραματικές βελτιώσεις στην αποτελεσματικότητα μετάδοσής του σε προηγουμένως αναποτελεσματικούς φορείς ή ακόμα και σε νέους. Τέτοια συμβάντα συμβάλλουν με τη σειρά τους στην επιβίωση, στην εξάπλωση και στην αύξηση της συχνότητας εμφάνισης διαφόρων αρμποιών (Braack *et al.*, 2018).

Το σίγουρο είναι ότι, παρόλο που έχουν δημοσιευθεί εις βάθος ανασκοπήσεις όλων αυτών των πιθανών παραγόντων, υπάρχει πάντα η ανάγκη επικαιροποίησης και επέκτασης των πληροφοριών σχετικά με τον ρόλο αυτών στην εμφάνιση και την εξάπλωση των αρμποιών (Cleton *et al.*, 2012).

#### 1.5.4 Σημαντικοί ιοί των οικογενειών Flaviviridae και Phenulviridae

##### 1.5.4.1 Οικογένεια Flaviviridae

Τα υπάρχοντα φυλογενετικά δέντρα υποδηλώνουν ότι η Αφρική ήταν ο προγονικός τόπος προέλευσης όλων των ιών της οικογένειας Flaviviridae που μεταδίδονται από κουνούπια και τσιμπούρια, και προέρχονται πιθανώς από ιούς θηλαστικών που αρχικά μεταδίδονταν χωρίς τη βοήθεια ενός αρθρόποδου φορέα. Τα τελευταία χρόνια η γεωγραφική τους διάδοση και τα επιδημιολογικά τους χαρακτηριστικά, επηρεάζονται πολύ από την αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού και τις πληθυσμιακές μετακινήσεις σε παγκόσμιο επίπεδο (Braack *et al.*, 2018). Η οικογένεια Flaviviridae χωρίζεται σε τρία γένη. Μόνο όμως το γένος Flavivirus περιλαμβάνει αρμποιούς, με μερικούς να είναι από τους πιο κλινικά σημαντικούς αρμποιούς παγκοσμίως (Cleton *et al.*, 2012).

Ο ιός του Κίτρινου Πυρετού (Yellow Fever Virus, YFV) προέρχεται από την Αφρική και εξαπλώθηκε με το εμπόριο των σκλάβων που χρονολογείται από το 1650 τουλάχιστον. Μεγάλες επιδημίες εμφανίστηκαν από το 1647 έως το 1650 και ξανά πάλι

τη δεκαετία του 1690. Ο ιός του Κίτρινου Πυρετού εξακολουθεί να προκαλεί περιοδικά κρούσματα έξαρσης στην Αφρική. Οι επιδημίες μπορεί να είναι εκτεταμένες, όπως στην Αιθιοπία, μεταξύ του 1960 και του 1962, που εκτιμάται ότι υπήρξαν περίπου 100.000 περιπτώσεις με 30.000 θανάτους ή όπως στο διάστημα μεταξύ 1984 και 1990, κατά το οποίο αναφέρθηκαν 22.647 περιπτώσεις από την Αφρική, εκ των οποίων 21.299 από τη Νιγηρία. Μια πρόσφατη επιδημία που αφορούσε και τις 18 επαρχίες στην Αγκόλα, ξεκίνησε τον Δεκέμβριο του 2015 και μέχρι τον Ιούλιο του 2016 είχε οδηγήσει σε περισσότερες από 3552 περιπτώσεις λοιμώξεων με 355 θνησιμότητες. Σήμερα, περισσότερο από το 90% των περιστατικών συμβαίνουν στην Υποσαχάρια Αφρική. Εκτιμάται ότι 51.000 έως 380.000 σοβαρές περιπτώσεις Κίτρινου Πυρετού συμβαίνουν συνολικά κάθε χρόνο παγκοσμίως, με 19.000 έως 180.000 θανάτους. Δεδομένης της ευρείας διάδοσης και αφθονίας του είδους των κουνουπιών που φέρουν τον ιό στη Νοτιοανατολική Ασία, όπου και συναντώνται υψηλές πυκνότητες ανθρώπινου πληθυσμού ιδανικές για εξάπλωση της νόσου, εξακολουθεί να είναι μεγάλο ερώτημα γιατί ο Κίτρινος Πυρετός δεν έχει κάνει το άλμα προς την περιοχή αυτή. Η Κίνα έχει μια ολοένα και πιο ισχυρή ομογενή κοινότητα στην Αφρική, συμπεριλαμβανομένης της Αγκόλας, από την οποία αρκετοί εργαζόμενοι που επιστρέφουν στην πατρίδα τους έχουν διαγνωστεί με εισαγόμενο ιό του Κίτρινου Πυρετού. Παρόλα αυτά, ευτυχώς μέχρι στιγμής το γεγονός αυτό δεν έχει οδηγήσει στην εγκαθίδρυση τοπικών μολυσματικών εστιών και τοπικών μεταδόσεων (Braack *et al.*, 2018).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus, WNV) απομονώθηκε πρώτη φορά από το αίμα ενός εμπύρετου ασθενούς στην Ουγκάντα το 1937. Η ασθένεια που προκαλεί εμφανίζεται ευρέως σε όλες σχεδόν τις χώρες της Αφρικής, από την Αίγυπτο ως τη Νότια Αφρική, στη Μέση Ανατολή, τη Νότια Ευρώπη, την Ασία, την Αυστραλία, την Καραϊβική, καθώς και την Αμερική (Εικόνα 2). Τα φυλογενετικά δένδρα υποδηλώνουν ότι ο ιός προέρχεται από την Αφρική και από εκεί διασκορπίστηκε ύστερα στις μεσογειακές χώρες και την Ευρώπη, φτάνοντας σήμερα στην τρέχουσα κατανομή του. Στις μέρες μας θεωρείται ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας της ιϊκής εγκεφαλίτιδας παγκοσμίως. Ήδη από τη δεκαετία του 1950 στις χώρες της Γαλλίας, της Ινδίας, του Ισραήλ, της Αιγύπτου και της Νότιας Αφρικής είχαν σημειωθούν σποραδικές εστίες ήπιας πυρετικής νόσου εξαιτίας του ιού, αλλά η συχνότητα, η σοβαρότητα και η γεωγραφική εμβέλεια αυξήθηκαν πολύ από τα μέσα της δεκαετίας του '90. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου εισήχθη τυχαία στη Νέα Υόρκη το 1999, όπου προκάλεσε 62 περιπτώσεις ανθρώπινης εγκεφαλίτιδας και 7 θανάτους. Στη συνέχεια εξαπλώθηκε στις ηπειρωτικές ΗΠΑ, τον Καναδά, το Μεξικό, την Κολομβία και την Καραϊβική. Ο ιός θεωρείται πλέον ενδημικός στην

Αμερική, όπου μεταξύ του 1999 και του 2013 σημειώθηκαν συνολικά 17.463 περιστατικά της νόσου και 1668 θάνατοι, κυρίως μικρών παιδιών και ηλικιωμένων ασθενών (Braack *et al.*, 2018). Η Ελλάδα βίωσε την πρώτη επιδημία από τον ιό το 2010, κάτι που έκτοτε έχει παραμείνει ως ένα σχεδόν ετήσιο συμβάν των θερινών μηνών, με μερικές μόνο εξαιρέσεις ([www.keelrno.gr](http://www.keelrno.gr), τελευταία επίσκεψη 23/5/2019).

Ο ιός Usutu (Usutu Virus, USUV) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1959 από ένα κουνούπι στη Νότια Αφρική, όμως υποστηρίζεται πως εμφανίστηκε 4 αιώνες νωρίτερα και εξαπλώθηκε σταδιακά στην Αφρικανική ήπειρο. Από τα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα και έπειτα, ακολούθησε η εισαγωγή και εξάπλωση του ιού σε Ευρωπαϊκές χώρες, κάτι που όμως έγινε γνωστό αρκετά αργότερα (Gaibani & Rossini, 2017). Συγκεκριμένα, τα πρώτα στοιχεία της κυκλοφορίας του ιού στην Ευρώπη προέκυψαν το 2001 (Weissenböck *et al.*, 2002). Ο USUV πλέον είναι ενδημικός σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες και συνεχώς παρατηρείται η διάδοσή του και σε νέες γεωγραφικές περιοχές (Εικόνα 2). Ακόμη, παρ' ότι οι κύριοι ξενιστές του ιού είναι πτηνά που ανήκουν σε ένα εύρος ειδών, μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί διάφορες περιπτώσεις λοίμωξης ανθρώπων, τόσο σε αφρικανικές όσο και σε ευρωπαϊκές χώρες (Gaibani & Rossini, 2017). Καθώς ο ιός Usutu αποτελεί αντικείμενο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια όπου και θα δοθούν πιο λεπτομερείς πληροφορίες.

Η ιστορική προέλευσή του ιού του Δάγκειου Πυρετού (Dengue Virus, DENV) παραμένει κάπως αόριστη, αν και γενικά περιγράφεται στη βιβλιογραφία ως ένας ιός με βασικό πυρήνα κατανομής στην Ασία, με μεγαλύτερη πιθανότητα να προέρχεται από τη Δυτική Αφρική. Ο ιός εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Αμερική περίπου την ίδια στιγμή με τον ιό του Κίτρινου Πυρετού, υπονοώντας ότι μπορεί να μεταφέρθηκαν εκεί με τον ίδιο τρόπο, μέσω δηλαδή της εισαγωγής σκλάβων. Όποια και αν είναι η ιστορική του προέλευση, ο ιός αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1943 και στη Χαβάη το 1945, ενώ εκείνη την εποχή αναφέρονταν και επιδημίες από την περιοχή της Ινδίας μέχρι τα νησιά του Ειρηνικού. Από εκείνες τις περιοχές, ο ιός εξαπλώθηκε για μια ακόμα φορά στην Αμερική τη δεκαετία του 1970 και στην Αφρική το 1984. Ακολούθησε η διασπορά του σε περισσότερες από 120 χώρες, κυρίως στις τροπικές και τις υποτροπικές περιοχές του πλανήτη, και σήμερα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μολυσματικές ασθένειες στον κόσμο, προκαλώντας σοβαρή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Υπολογίζεται ότι 50 με 100 εκατομμύρια κρούσματα Δάγκειου Πυρετού και 250 με 500.000 κρούσματα αιμορραγικού Δάγκειου Πυρετού αναφέρονται σε όλο τον κόσμο κάθε χρόνο, κυρίως σε μικρά παιδιά, με τα ποσοστά θνησιμότητας να κυμαίνονται από 0,5% έως 5% στις ασιατικές χώρες. Ο ιός του Δάγκειου Πυρετού προκαλεί περισσότερες λοιμώξεις και θάνατο από οποιαδήποτε



άλλο αρμυπόϊό που μολύνει τους ανθρώπους (Braack *et al.*, 2018). Στην Ελλάδα, μετά την επιδημία του 1927-1928 στην πρωτεύουσα, που ήταν και η τελευταία πολύ μεγάλη στην Ευρώπη, δεν έχουν καταγραφεί ξανά αυτόχθονα κρούσματα, παρά μόνο εισαγόμενα ([www.keelrpo.gr](http://www.keelrpo.gr), τελευταία επίσκεψη 23/5/2019).

Εικόνα 2: Γεωγραφική κατανομή αρμυπόϊων που σχετίζονται με ανθρώπινες λοιμώξεις στην Ευρώπη και στη λεκάνη της Μεσογείου, μεταξύ των οποίων είναι και ο USUV (Barzon, 2018)

#### 1.5.4.2 Οικογένεια Phenuiviridae της τάξης Bunyvirales

Οι τάξη Bunyvirales είναι αρκετά μεγάλη και περιλαμβάνει διάφορους ιατρικά σημαντικούς αρμυπόϊους, οι οποίοι συσπειρώνονται κυρίως στα γένη Orthobunyavirus, Phlebovirus και Nairovirus. Τα αποτελέσματα φυλογενετικών αναλύσεων υποδεικνύουν τις προγονικές συσχετίσεις των ιών αυτών με τα αρθρόποδα, σε μεγάλο μάλιστα βάθος εξελικτικού χρόνου, καθώς και την ήπειρο της Αφρικής ως τον

προγονικό τόπο προέλευσής τους (Braack *et al.*, 2018). Το γένος Phlebovirus περιέχει αρκετά είδη αρμποϊών. Από τους πιο κλινικά σημαντικούς είναι ο ιός Toscana, ο οποίος μεταδίδεται από σκνίπες, και ο ιός του πυρετού της ρηξιγενούς κοιλάδας, ο οποίος μεταδίδεται από κουνούπια (Cleton *et al.*, 2012).

Ο ιός Toscana (Toscana Virus, TOSV) απομονώθηκε αρχικά το 1971 από μια σκνίπα που συλλέχθηκε στην ευρύτερη περιοχή της Τοσκάνης, στην κεντρική Ιταλία (Valassina *et al.*, 2003). Ο ιός αυτός προκαλεί νευροδισευδυντικές λοιμώξεις κατά βάση σε ανθρώπους και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών (Alkan *et al.*, 2013). Μετά το 2000, έγινε αντιληπτό ότι ο TOSV είχε πολύ μεγαλύτερο εύρος γεωγραφικής κατανομής από αυτό που αρχικά είχε εκτιμηθεί και είναι παρών στις περισσότερες χώρες της Δυτικής Ευρώπης που βρίσκονται στα βόρεια σύνορα της Μεσογείου, καθώς και σε χώρες ανατολικά αυτής (Εικόνα 3). Δυστυχώς, μέχρι σήμερα, τα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν τη Βόρεια Αφρική και άλλες χώρες που βρίσκονται νότια της Μεσογείου είναι λίγα και αρκετά σπάνια (Charrel *et al.*, 2012). Καθώς ο ιός Toscana αποτελεί αντικείμενο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια όπου και θα δοθούν πιο λεπτομερείς πληροφορίες.

Ο ιός του Πυρετού της Ρηξιγενούς Κοιλάδας (Rift Valley Fever Virus, RVFV) ανήκει στην οικογένεια Phenuiviridae της ευρύτερης τάξης Bunyvirales, και πιο συγκεκριμένα στο γένος των Phleboviruses. Ο ιός εμφανίστηκε πρώτη φορά στην Κένυα το 1931 και με τα χρόνια επεκτάθηκε σε όλη την Αφρική, τη Μαδαγασκάρη και την Αραβική Χερσόνησο. Προκαλεί περιοδικές επιδημίες με ενίοτε δραματικό αντίκτυπο, όπως για παράδειγμα στη Νότιο Αφρική το 1950-1951, όπου προκάλεσε το θάνατο περισσότερων από 100.000 προβάτων και 500.000 αμβλώσεων. Οι επιδημίες εμφανίζονται επίσης και σε άλλα ζώα όπως τα αιγοειδή και τα βοοειδή, με χαρακτηριστικά παραδείγματα σε χώρες όπως η Μοζαμβίκη, η Ναμίμπια, η Ζάμπια, η Ζιμπάμπουε και πολλές άλλες στη νότια και ανατολική Αφρική. Οι ανθρώπινες λοιμώξεις συνδέονται τακτικά με αυτές τις περιπτώσεις επιδημιών στα ζώα, συμπεριλαμβανομένης μιας πρωτοφανούς εκτόξευσης των περιστατικών που άγγιξε τα 200.000 άτομα, εκ των οποίων 598 έχασαν τη ζωή τους, στην κοιλάδα του Νείλου και του δέλτα του ποταμού στην Αίγυπτο το 1977-1978. Σήμερα, έχουν σημειωθεί σημαντικές προσπάθειες για την ανάπτυξη μαθηματικών και κλιματικών μοντέλων για την πρόβλεψη νέων επιδημιών του ιού αυτού (Braack *et al.*, 2018).

Η Αφρική, λοιπόν, φαίνεται να είναι όχι μόνο το προγονικό λίκνο της ανθρωπότητας, αλλά και το έδαφος αναπαραγωγής πολλών ζωονοσογόνων ασθενειών, ιδίως αρμποϊών. Είναι πολύ πιθανό ότι η Αφρική διαθέτει το μεγαλύτερο δυναμικό για την εμφάνιση και άλλων νέων ιών και ασθενειών, που ίσως ακόμα να

βρίσκονται σε μια αδρανή κατάσταση, κρυμμένοι στις αχανείς εκτάσεις της (Braack *et al.*, 2018).

Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή αρμυοϊών που σχετίζονται με ανθρώπινες λοιμώξεις στην Ευρώπη και στη λεκάνη της Μεσογείου, μεταξύ των οποίων είναι και ο TOSV (Barzon, 2018)

#### 1.5.5 Κλινική εικόνα αρμυοϊκών λοιμώξεων

Τα κλινικά συμπτώματα που εμφανίζουν όσοι άνθρωποι μολύνονται από αρμυοϊούς, μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερα κύρια κλινικά σύνδρομα. Τα σύνδρομα αυτά είναι:

- η ήπια ή σοβαρή εμπύρετη ασθένεια (Febrile Disease, FD),
- το εξάνθημα και η αρθραλγία (Arthralgia - Rash, AR),
- το νευρολογικό σύνδρομο (Neurological Syndrome, NS) και
- το αιμορραγικό σύνδρομο (Hemorrhagic Syndrome, HS).

Εκτός αυτών, αναφέρονται επίσης και άλλα συμπτώματα όπως η ηπατίτιδα, η βρογχοπνευμονία και επιπεφυκίτιδα. Η εμπύρετη ασθένεια εμφανίζει γενικά συμπτώματα που μοιάζουν με την κοινή γρίπη όπως ο πυρετός, η κεφαλαλγία, ο οπισθοκογχικός πόνος και η μυαλγία. Το νευρολογικό σύνδρομο μπορεί να εκδηλωθεί ως μυελίτιδα, μηνιγγίτιδα ή και εγκεφαλίτιδα, με αλλαγές συμπεριφοράς, παράλυση, παρέςεις, σπασμούς και προβλήματα συντονισμού. Το αρθραλγικό σύνδρομο εκδηλώνεται συνήθως ως εξάνθημα ή μακροσφαιρικό εξάνθημα, πολυαρθραλγία και πολυαρθρίτιδα. Το αιμορραγικό σύνδρομο μπορεί να παρουσιαστεί κλινικά με την εμφάνιση πετεχίων, δηλαδή κηλίδων στο δέρμα από σπασμένα αγγεία, με αυθόρμητη ή επίμονη αιμορραγία και σοκ, σε συνδυασμό με σοβαρά χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων και αυξημένα ηπατικά ένζυμα. Τα σύνδρομα επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό, καθιστώντας έτσι αδύνατη τη διάγνωση μόνο με βάση τα κλινικά συμπτώματα (Cleton *et al.*, 2012).

#### 1.5.6 Πρόληψη και θεραπεία αρμποιϊκών λοιμώξεων

Ανάλογα με την αιτιολογία, μπορεί να εμφανιστούν διάφορες επιπλοκές όταν μια αρμποιϊκή ασθένεια εκτείνεται πέρα από το στάδιο του απλού πυρετού. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένες αποτελεσματικές αντιϊκές θεραπείες για οποιονδήποτε από τους γνωστούς σήμερα αρμποιϊούς, και επομένως, για την καταπολέμηση των συμπτωμάτων, μπορεί να βοηθήσει μόνο η απλή υποστηρικτική φροντίδα, με διαχείριση των υγρών, χορήγηση ηλεκτρολυτών και μη-ειδικά φαρμακευτικά σκευάσματα όπως αναλγητικά και αντιφλεγμονώδη. Σίγουρα η έγκαιρη διάγνωση και η επιβεβαίωση της ασθένειας καθιστά δυνατή την προσαρμογή της υποστηρικτικής φροντίδας για την αποφυγή μιας ποικιλίας επιπλοκών, αυξάνοντας έτσι σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης. Πηγαίνοντας ένα βήμα πίσω, για την πρόληψη της μόλυνσης από αρμποιϊούς συνίσταται συνήθως η χρήση εντομοαπωθητικών, η προστασία του χώρου διαβίωσης με σίτες και κουνουπιέρες, καθώς και οι τακτικοί έλεγχοι για πιθανή ύπαρξη κουνουπιών, τσιμπουριών και σκνιπών στο χώρο. Δυστυχώς εμβόλια είναι διαθέσιμα μόνο για πολύ λίγους αρμποιϊούς και συγκεκριμένα, για τον ιό του Κίτρινου Πυρετού (Yellow Fever Virus, YFV), τον ιό της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας (Japanese Encephalitis Virus, JEV) και τον ιό της Κροτωγενούς Εγκεφαλίτιδας (Tick-borne Encephalitis) (Cleton *et al.*, 2012).

## 1.6 Ιός Usutu

### 1.6.1 Γενικά στοιχεία για την εμφάνιση και την απομόνωση του ιού

Ο ιός Usutu (Usutu Virus, USUV) είναι ένας αρμποϊός που μεταδίδεται από κουνούπια, ανήκει στο γένος *Flavivirus* και κατατάσσεται εντός της οικογένειας *Flaviviridae*. Ως μέλος του αντιγονικού συμπλέγματος του ιού της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας (Japanese Encephalitis Virus, JEV), ο USUV σχετίζεται στενά με πολυάριθμα ανθρώπινα και ζωικά παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου του ιού του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus, WNV), του ιού της εγκεφαλίτιδας Murray Valley (Murray Valley Encephalitis Virus, MVEV) και του ιού της εγκεφαλίτιδας του Saint Louis (St Louis Encephalitis Virus, SLEV) (Εικόνα 4). Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1959 από ένα κουνούπι του είδους *Culex neavei* στην αποικία Νατάλ της Νότιας Αφρικής και πήρε το όνομά του από έναν ποταμό της Σουαζιλάνδης (Weissenböck *et al.*, 2002; Nikolay *et al.*, 2011).

Ευρήματα μιας πρόσφατης μελέτης στηρίζουν την υπόθεση ότι ο USUV εμφανίστηκε στην Αφρική στις αρχές του 16<sup>ου</sup> αιώνα και ότι, μέχρι τα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, η εξάπλωση του περιορίστηκε αποκλειστικά στην αφρικανική ήπειρο (Gaibani & Rossini, 2017). Το διάστημα αυτό πράγματι ο ιός είχε εντοπιστεί σε διάφορα είδη πουλιών και κουνουπιών, σε αρκετές μάλιστα χώρες όπως η Σενεγάλη, η Κεντρική Δημοκρατία της Αφρικής, η Νιγηρία, η Ουγκάντα, η Μπουρκίνα Φάσο, η Ακτή Ελεφαντοστού και το Μαρόκο (Nikolay *et al.*, 2011). Οι εισαγωγές του USUV στην Ευρώπη από την Αφρική πιθανότατα ξεκίνησαν τα τελευταία 50 χρόνια και συνεχίζουν να συμβαίνουν. Υπάρχουν οι υποθέσεις ότι ο ιός εισήχθη για πρώτη φορά στην Ευρώπη από πτηνά μεταξύ 1950-1960 στην Ισπανία, ενώ μεταγενέστερες εισαγωγές σημειώθηκαν αντίστοιχα μεταξύ 1970-1980 στην Ιταλία και την Αυστρία και μεταξύ 1984-2006 στην Ισπανία (Gaibani & Rossini, 2017). Τα πρώτα στοιχεία της κυκλοφορίας του USUV στην Ευρώπη όμως, προέκυψαν το 2001 στην Αυστρία και σχετίζονταν με θανάτους σε διάφορα είδη πτηνών, κυρίως κοτσυφιών (*Turdus merula*) (Weissenböck *et al.*, 2002). Ωστόσο, μια αναδρομική ανάλυση αρχειοθετημένων δειγμάτων ιστών από νεκρά κοτσύφια στην Τοσκάνη της Ιταλίας, παρείχε στοιχεία που υποδείκνυαν ότι ο ιός προέκυψε σε παθογόνο μορφή στην Ευρώπη το 1996 ή και νωρίτερα (Gaibani & Rossini, 2017).

Εικόνα 4: Φυλογενετικό δέντρο που υποδεικνύει την στενή συσχέτιση του ιού Usutu με ιούς του γένους *Flavivirus* (Cook & Holmes, 2006)

#### 1.6.2 Φορείς και ξενιστές του USUV

Ο φυσικός κύκλος ζωής του USUV περιλαμβάνει орνιθοφιλικά κουνούπια ως φορείς και πτηνά ως τον κύριο ενισχυτικό ξενιστή. Συγκεκριμένα, μέχρι τώρα, έχει βρεθεί σε οκτώ είδη τα οποία ανήκουν στα γένη *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Coquillettidia* και *Mansonia* (Gaibani & Rossini, 2017). Ο κύριος και πιο κοινός φορέας μετάδοσης όμως του USUV είναι το είδος *Culex pipiens* (Calzolari *et al.*, 2012). Ο κύκλος ζωής του ιού είναι παρόμοιος με αυτόν άλλων φλαβοϊών που ανήκουν στο οροσύμπλεγμα του ιού της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας, όπου οι άνθρωποι θεωρούνται τυχαίοι ή «αδιέξοδοι» ξενιστές. Η λοίμωξη από τον ιό, εκτός των ανθρώπων, έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη θηλαστικών και συγκεκριμένα, έχει τεκμηριωθεί σε νυχτερίδες (*Pipistrellus pipistrellus*), άλογα, σκύλους και ελάφια (*Cervus elaphus*) (Gaibani & Rossini, 2017).

Πτηνά που ανήκουν σε ένα εύρος ειδών ενδέχεται να μολυνθούν από τον USUV και ορισμένα από αυτά μπορεί να αναπτύξουν συμπτώματα ασθένειας. Συγκεκριμένα, ο ιός ανά τα χρόνια έχει ανιχνευθεί σε 62 είδη πουλιών στις αφρικανικές

αλλά και τις ευρωπαϊκές χώρες. Διάφορα άγρια αποδημητικά είδη, όπως για παράδειγμα τα *Falco tinnunculus*, *Acrocephalus scirpaceus*, *Sylvia curruca*, *Sylvia communis* και *Ficedula hypoleuca*, θεωρούνται υπεύθυνα για την εισαγωγή του USUV στην Ευρώπη από την Αφρική, ενώ άλλα, όπως τα *Pica pica*, *Passer domesticus*, *Gallus gallus* και *Turdus merula*, θεωρούνται υπεύθυνα για τη διάδοσή του σε αυτήν. Είναι ενδιαφέρον ότι ο USUV έχει υπάρξει υπεύθυνος για ένα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ διαφόρων ειδών πτηνών στην Ευρώπη, και ιδιαιτέρως κοτσυφιών (*Turdus merula*), ενώ στην Αφρική και την Ισπανία τα αντίστοιχα ποσοστά είναι δραματικά πιο μικρά. Τα μολυσμένα πτηνά ενδέχεται να παρουσιάζουν συμπτώματα που ποικίλλουν από ήπια έως σοβαρά, με τα σοβαρά συμπτώματα να περιλαμβάνουν περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας, εκφυλισμού του μυοκαρδίου, καθώς και νέκρωση του ήπατος και του σπλήνα (Nikolay *et al.*, 2011; Gaibani & Rossini, 2017).

### 1.6.3 Περιοχές που ενδημεί και εμφανίζεται ο USUV

Τα χρόνια που ακολούθησαν μετά τα πρώτα στοιχεία της κυκλοφορίας του USUV στην Αυστρία το 2001, ο ιός εντοπίστηκε και απομονώθηκε από κουνούπια, πουλιά και νυχτερίδες σε πολλές ακόμη ευρωπαϊκές χώρες όπως η Ουγγαρία, η Ελβετία, η Ισπανία, η Ιταλία, η Τσεχία, η Γερμανία, το Βέλγιο και η Γαλλία. Επιπλέον, η λοίμωξη από τον ιό αυτό έχει αποδειχθεί ορολογικά και σε πτηνά στην Αγγλία, την Πολωνία και την Ελλάδα, καθώς και σε άλογα στη Σερβία (Vazquez *et al.*, 2011; Gaibani & Rossini, 2017). Όσον αφορά στην Ελλάδα, ο ιός Usutu εντοπίστηκε το Νοέμβριο του 2010 σε ένα περιστέρι στην περιοχή της Βέροιας, στη Μακεδονία. Αυτό συνέβη στα πλαίσια ενός συστήματος επιδημιολογικής επιτήρησης κατά την επιδημία του ιού του Δυτικού Νείλου το 2010 (Εικόνα 5). Η γεωγραφική εξάπλωση του USUV στην Ελλάδα δυστυχώς είναι ακόμη άγνωστη και σίγουρα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να εκτιμηθεί η σημασία του ως ανθρώπινου παθογόνου παράγοντα στη χώρα μας (Chaintounis *et al.*, 2014).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, ο USUV εντοπίζεται επανειλημμένα εδώ και αρκετά χρόνια στην Αυστρία (2001-2006), την Ουγγαρία (2003-2006), την Ιταλία (2009-2016), την Ισπανία (2006, 2009, 2012) και τη Γερμανία (2010-2015), και κατά συνέπεια, θεωρείται ενδημικός στις περιοχές αυτές. Υπάρχει βέβαια και το λιγότερο πιθανό σενάριο της επανεισαγωγής του ιού, αν και δεν υποστηρίζεται ιδιαίτερα από τα επιστημονικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, η μερική ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ιικών στελεχών από τις περιοχές αυτές έδειξε πως κατά 99% ταυτίζονταν (Vazquez *et al.*, 2011; Gaibani & Rossini, 2017). Πιο πρόσφατα, το καλοκαίρι του 2016, μια μεγάλη επιζωοτία USUV καταγράφηκε στην Ευρώπη με πολλαπλά κρούσματα στο

Βέλγιο, τη Γερμανία, τη Γαλλία και για πρώτη φορά στην Ολλανδία, προβάλλοντας έτσι τη συνεχή γεωγραφική εξάπλωση του USUV και σε νέες οικολογικές θέσεις (Gaibani & Rossini, 2017).

Συχνά, σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες παρατηρείται η ταυτόχρονη κυκλοφορία του USUV με τον ιό του Δυτικού Νείλου, τόσο όσον αφορά στη γεωγραφική περιοχή της μετάδοσής τους, αλλά και όσον αφορά στους φορείς και ξενιστές που εμπλέκονται σε αυτήν. Λαμβάνοντας υπόψη τις διασταυρούμενες ανοσολογικές αντιδράσεις μεταξύ αυτών των δύο ιών, παραμένει να διασαφηνιστεί εάν αυτή η αλληλοεπικάλυψη μπορεί να επηρεάσει τα χωροχρονικά πρότυπα της κυκλοφορίας του USUV στην Ευρώπη (Gaibani & Rossini, 2017).

Εικόνα 5: Με μαύρο στίγμα υποδεικνύονται οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί στην Ευρώπη για τον ιό Usutu σε κουνούπια και πτηνά (Ashraf *et al.*, 2015)

#### 1.6.4 Περιστατικά μόλυνσης από USUV σε ανθρώπους

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί διάφορες περιπτώσεις λοίμωξης ανθρώπων από τον ιό Usutu, τόσο σε αφρικανικές όσο και σε ευρωπαϊκές χώρες. Συνολικά τα κρούσματα με εμφανή συμπτώματα που έχουν αναφερθεί ως τώρα, ανέρχονται σε 21 (Gaibani & Rossini, 2017). Η πρώτη περίπτωση μόλυνσης USUV στον άνθρωπο ανιχνεύτηκε το 1981 στην Κεντρική Δημοκρατία της Αφρικής, σε έναν ασθενή με έντονο πυρετό και εξανθήματα, από ερευνητές του Ινστιτούτου Παστέρ του Ντακάρ. Η δεύτερη περίπτωση εντοπίστηκε στη Μπουρκίνα Φάσο το 2004, σε ένα νεαρό αγόρι με ψηλό πυρετό και ίκτερο (Nikolay *et al.*, 2011). Πέντε χρόνια μετά, το 2009, αναφέρθηκαν τα πρώτα κρούσματα μηνιγγοεγκεφαλίτιδας σε δύο ανοσοκατεσταλμένα άτομα στην



Ιταλία, λόγω λοίμωξης από τον ιό Usutu (Calzolari *et al.*, 2012). Ο ένας ασθενής έπασχε από διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα λέμφωμα και παρουσίαζε πυρετό σε συνδυασμό με νευρολογικά συμπτώματα, ενώ ο δεύτερος ασθενής είχε υποβληθεί σε ορθοτροπική μεταμόσχευση ήπατος (Orthotropic Liver Transplant, OLT). Μετέπειτα, ο USUV εντοπίστηκε και σε δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού τριών ασθενών με οξεία μηνιγγοεγκεφαλίτιδα που συλλέχθηκαν στο χρονικό διάστημα μεταξύ 2008 και 2009 (Gaibani & Rossini, 2017). Μάλιστα, μια πρόσφατη αναδρομική μελέτη που διεξήχθη στο δήμο Modena, στην περιοχή Emilia-Romagna της Ιταλίας, τεκμηρίωσε την προγενέστερη μόλυνση USUV σε ασθενείς με υποψία ιογενούς εγκεφαλίτιδας ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, κατά την ίδια χρονική περίοδο (Grottola *et al.*, 2017). Αργότερα, το 2013 στην Κροατία, η νευροδισιδυτική μόλυνση που σχετίζεται με τον ιό, εντοπίστηκε σε τρεις ακόμα ασθενείς. Ο ένας από αυτούς ήταν μια 29χρονη κοπέλα που εμφάνιζε αποπροσανατολισμό και υπνηλία, ακολουθούμενη από παρατεταμένη περίοδο δυσκολιών στη μνήμη και την ομιλία (Tetro, 2017). Η πιο πρόσφατη περίπτωση ανθρώπινης μόλυνσης USUV αφορά έναν υγιή αιμοδότη και έγινε αντιληπτή το 2016 στη Γερμανία (Cadar, 2017).

Αξίζει να αναφερθεί ότι, ανά τα χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες έχουν ανιχνεύσει αντισώματα ενάντια στον ιό Usutu σε ανθρώπους. Τα δείγματα ορών που εξετάστηκαν, συλλέχθηκαν από χώρες όπως η Γερμανία, η Ιταλία, η Σερβία και άλλες. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτές τις μελέτες, ο ορολογικός επιπολασμός των ειδικών αντισωμάτων για τον USUV σε υγιείς δότες αίματος κυμαίνεται από 0,02% έως 1,1% μεταξύ των διαφόρων χωρών της Ευρώπης (Gaibani & Rossini, 2017).

#### 1.6.5 Κλινική εικόνα του ιού Usutu

Στους ανθρώπους η μόλυνση με τον USUV μπορεί να είναι ασυμπτωματική, χωρίς δηλαδή εμφανή συμπτώματα και σημάδια λοίμωξης, ή μπορεί να σχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα στις περιπτώσεις αυτές ποικίλουν από μέτρια, όπως για παράδειγμα εξάνθημα, πυρετός και κεφαλαλγία, έως σοβαρά, όπως ίκτερος, ακαμψία του αυχένα, τρέμουλο και διάφορες άλλες νευρολογικές διαταραχές (Cadar, 2017; Gaibani & Rossini, 2017). Τα πιο έντονα νευρολογικά σύνδρομα που μπορεί να προκληθούν εξαιτίας της λοίμωξης από τον USUV είναι η μηνιγγίτιδα, η εγκεφαλίτιδα και συνδυαστικά, η μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Η εγκεφαλίτιδα είναι φλεγμονή των μεμβρανών που περιβάλλουν τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό **και** διακρίνεται σε πρωτογενή, όταν ο ιός εισέρχεται απευθείας στον εγκέφαλο, που είναι και η πιο σοβαρή περίπτωση και σε δευτερογενή, όταν ο ιός εισέρχεται στον

εγκέφαλο από την συστηματική κυκλοφορία και εξελίσσεται ηπιότερα. Μηνιγγίτιδα αποκαλείται η φλεγμονή των τριών προστατευτικών μεμβρανών που περιβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και συνολικά είναι γνωστές ως μήνιγγες. Κατά συνέπεια, η μηνιγγοεγκεφαλίτιδα είναι η φλεγμονή τόσο του εγκεφάλου όσο και των μηνίγγων. Το οίδημα μπορεί συνοδευτικά να προκαλέσει αυξημένη πίεση στον ιστό του εγκεφάλου και των νεύρων και να βλάψει πρόσκαιρα ή μόνιμα τα νεύρα, υπονομεύοντας έτσι τη λειτουργία τους. Η μηνιγγίτιδα και η εγκεφαλίτιδα μπορούν επίσης να βλάψουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος διαχωρίζει τον εγκέφαλο από την κυκλοφορία του αίματος και επιπλέον, ρυθμίζει την διέλευση ουσιών μεταξύ του αίματος και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY).

#### 1.6.6 Γενικά χαρακτηριστικά και μοριακή δομή του USUV

Ο USUV είναι ένας μικρός σφαιρικός ιός με λιπιδικό περίβλημα που προέρχεται από τη μεμβράνη του εκάστοτε κυττάρου ξενιστή. Έχει διάμετρο 40-60 nm και περιέχει μονόκλωνο θετικό γονιδίωμα RNA μήκους 11.064-11.066 νουκλεοτιδίων, χωρίς 3' πολυ(A) ουρά. Η γονιδιωματική οργάνωση παρουσιάζει παρόμοια δομή με άλλων φλαβοϊών. Συγκεκριμένα, το γονιδίωμα διαθέτει δομή καλύπτρας στο 5' άκρο, ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) και δύο αμετάφραστες περιοχές (Untranslated Regions, UTRs). Οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές ποικίλουν αντίστοιχα σε μήκος μεταξύ 95 έως 96 νουκλεοτιδίων και 631 έως 664 νουκλεοτιδίων, ανάμεσα στα διάφορα στελέχη, και εμπλέκονται στην μετάφραση και την αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος. Η κωδικοποιούσα περιοχή μεταγράφεται και μεταφράζεται σε μια μοναδική πολυπρωτεΐνη 3434 αμινοξέων που μεταμεταφραστικά επεξεργάζεται και διαχωρίζεται σε τρεις δομικές (καψιδίου, φακέλου και προμεμβράνης) και οκτώ μη δομικές πρωτεΐνες (Non Structural, NS)(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B και NS5). Όπως και σε άλλους φλαβοϊούς, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες, δηλαδή τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν το σωματίδιο του ιού, βρίσκονται στο 5' άκρο του ιϊκού γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη του καψιδίου (Capsid, C) σχηματίζει τον κεντρικό πυρήνα του ιϊκού σωματιδίου και συνδέεται με το ιϊκό RNA, η γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου (Envelope, E) μεσολαβεί για τη δέσμευση στα κύτταρα ξενιστές και προάγει την είσοδο του ιού σε αυτά, και η προμεμβρανική πρωτεΐνη (pre-Membrane, prM) είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση και την ωρίμανση του ιού καθώς βοηθά στην αναδίπλωση του φακέλου. Οι μη δομικές πρωτεΐνες χρησιμεύουν σε διάφορες λειτουργίες κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Η NS1 υπάρχει σε διακριτές μορφές, συγκεκριμένα κυτταρική και εκκρινόμενη, και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος και την

ωρίμανση του ιού. Οι NS2A, NS2B, NS4A και NS4B είναι μικρές, υδρόφοβες πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση του ιού και παίζουν ένα ρόλο στην αναστολή της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα των ιντερφερονών. Οι NS3 και NS5 είναι δύο πρωτεΐνες με διάφορες ενζυμικές δραστηριότητες. Η NS3 πρωτεΐνη κωδικοποιεί για ιϊκή πρωτεάση σερίνης (δραστηκή μόνο παρουσία του συμπαραγόντα NS2B), για ελικάση, για νουκλεοσιδική τριφωσφατάση και για RNA τριφωσφατάση. Η NS5 πρωτεΐνη κωδικοποιεί για μεθυλτρανσφεράση στο αμινικό άκρο της, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο κωδικοποιεί για την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (Gaibani & Rossini, 2017).

#### 1.6.7 Γενετική ποικιλία και φυλογενετική του USUV

Τα στελέχη USUV κατατάσσονται σε οκτώ γενεαλογίες οι οποίες με τη σειρά τους διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες, αφρικανικές και ευρωπαϊκές, με βάση τη γεωγραφική θέση απομόνωσης του εκάστοτε στελέχους. Σε αυτό το σημείο πρέπει αναφερθεί ότι η συντριπτική πλειοψηφία των απομονωμένων στελεχών Usutu προέρχεται από διάφορα είδη πτηνών εκ των προαναφερθέντων, ενώ ελάχιστα από ανθρώπους. Φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στο γονίδιο NS5 έδειξε ότι τα στελέχη USUV από την Αφρική ανήκουν σε τρεις διακεκριμένες γενεαλογίες (Africa 1-3), ενώ η ευρωπαϊκή ομάδα αποτελείται από πέντε διαφορετικές γενεαλογίες (Europa 1-5) (Gaibani & Rossini, 2017).

Η γενεαλογία Africa 1 περιλαμβάνει μόνο ένα στέλεχος, το CAR-1969, που απομονώθηκε στην Κεντρική Δημοκρατία της Αφρικής το 1969. Η γενεαλογία Africa 2, που προέρχεται από τη Νότιο Αφρική και εμφανίστηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1940, περιλαμβάνει στελέχη USUV που έχουν απομονωθεί στη Σενεγάλη, την Ισπανία, τη Γερμανία και τη Γαλλία. Η γενεαλογία Africa 3 περιλαμβάνει στελέχη που έχουν απομονωθεί στη Σενεγάλη, τη Γερμανία, τις Κάτω Χώρες και το Βέλγιο, καθώς και ένα στέλεχος που απομονώθηκε από άνθρωπο στην Κεντρική Δημοκρατία της Αφρικής το 1981, το CAR-1981. Η γενεαλογία Europa 1 προέκυψε από έναν πρόγονο που υπήρχε στη Σενεγάλη και αποτελείται από στελέχη απομονωμένα στην Αυστρία, την Ουγγαρία, την Ελβετία, τη Σενεγάλη και πιο πρόσφατα, στην Ιταλία. Η γενεαλογία Europa 2 αποτελείται από στελέχη που έχουν απομονωθεί στην Ιταλία και την Τσεχία, συμπεριλαμβανομένου του στελέχους Bologna-2009 που απομονώθηκε από ασθενή με μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Η γενεαλογία Europa 3 περιλαμβάνει στελέχη USUV από τη Γερμανία, το Βέλγιο και τη Γαλλία, ενώ η Europa 4 αποτελείται από στελέχη USUV από την Ιταλία, συμπεριλαμβανομένων κάποιων ανθρώπινων στελεχών. Τέλος, η

πρόσφατα ορισθείσα γενεαλογία Eurora 5 περιλαμβάνει διάφορα στελέχη που απομονώθηκαν από τη Γερμανία (Gaibani & Rossini, 2017).

Η ομολογία του γονιδιώματος μεταξύ απομονωθέντων στελεχών είναι υψηλότερη από 94%, με εξαίρεση το στέλεχος CAR-1969 το οποίο εμφανίζει ομολογία νουκλεοτιδίων 78,3% σε σύγκριση με άλλα στελέχη USUV. Ακόμη, η σύγκριση των αμετάφραστων περιοχών (UTR) έδειξε ότι η 5' UTR διατηρεί παρόμοιο μέγεθος και δευτερογενή δομή μεταξύ των διαφορετικών γενεαλογιών, με εξαίρεση την Africa 1. Ταυτόχρονα, στην 5' UTR παρατηρούνται συγκεκριμένες μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων μεταξύ αφρικανικών και ευρωπαϊκών γενεαλογιών (A3T, T4C, C10T και T14C). Όσον αφορά στην 3' UTR, παρατηρείται υψηλή ανομοιογένεια στο μήκος αυτής μεταξύ των διαφορετικών γενεαλογιών USUV (Gaibani & Rossini, 2017).

#### 1.6.8 Ανίχνευση, διάγνωση και κινητική του USUV

Η λοίμωξη USUV μπορεί να διαγνωστεί με την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων, ιϊκού RNA γονιδιώματος ή και με απομόνωση του ιού σε κυτταρική καλλιέργεια. Με εξαίρεση μια επικυρωμένη ορολογική μέθοδο ανίχνευσης IgG αντισωμάτων που παρασκευάζεται από την εταιρία Euroimmun, προς το παρόν δεν υπάρχουν άλλες εμπορικά διαθέσιμες επικυρωμένες ορολογικές ή μοριακές μέθοδοι διάγνωσης. Γενικά, η ανίχνευση αντισωμάτων πραγματοποιείται με την βοήθεια της ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ή με δοκιμές ανοσοφθορισμού με χρήση αντιγόνων USUV. Οποιοδήποτε θετικό αποτέλεσμα εντοπίζεται χρησιμοποιώντας αυτές τις μεθόδους, πρέπει να επιβεβαιωθεί με πιο συγκεκριμένες δοκιμές, όπως δοκιμή εξουδετέρωσης πλάκας (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT) ή δοκιμή μικρο-εξουδετέρωσης (micro Neutralization Assay, mNTA), για να αποκλειστεί η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με αντισώματα έναντι στενά συγγενών φλαβοϊών (π.χ. WNV). Για την επιβεβαίωση ανθρώπινων περιστατικών, θα πρέπει να καταδειχθεί ορομετατροπή, δηλαδή τετραπλάσια ή μεγαλύτερη αύξηση των τίτλων των ειδικών αντισωμάτων σε δείγματα που λαμβάνονται σε απόσταση 10-15 ημερών από τον ασθενή (Gaibani & Rossini, 2017).

Η άμεση διάγνωση οξείας λοίμωξης από τον USUV βασίζεται στην ανίχνευση γενετικού υλικού του ιού σε κλινικά δείγματα, όπως αίμα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό, με μεθόδους ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων. Στην βιβλιογραφία περιγράφονται αρκετές μέθοδοι που μπορούν, είτε να αναγνωρίσουν τον USUV με εξειδικευμένες δοκιμές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time Polymerase Chain Reaction - real time PCR), είτε να ανιχνεύσουν φλαβοϊούς σε ευρύτερο βαθμό,

μέσω μεθόδων real-time PCR με εκκινητές που στοχεύουν σε πολύ συντηρημένες γονιδιωματικές αλληλουχίες του γένους αυτού. Στην δεύτερη περίπτωση η ταυτοποίηση του ιού πραγματοποιείται εκ των υστέρων με την αλληλούχηση των προϊόντων που προκύπτουν από την PCR. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη μετέπειτα φυλογενετική ανάλυση των ευρημάτων για την ταξινόμηση των κυκλοφορούντων ιικών στελεχών (Nikolay *et al.*, 2011; Gaibani & Rossini, 2017).

Παρόλο που δεν υπάρχει μεγάλη εμπειρία στις λοιμώξεις ανθρώπων από τον USUV, υπολογίζεται ότι η περίοδος επώασης του ιού στον οργανισμό κυμαίνεται από 2 έως 14 ημέρες. Κατά το διάστημα αυτό ο ιός είναι ανιχνεύσιμος με μοριακές μεθόδους που στοχεύουν στον εντοπισμό του ιικού γονιδιώματος, ενώ η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων είναι λιγότερο πιθανή, ειδικά τις πρώτες μέρες που ακολουθούν την αρχική λοίμωξη. Τα IgM αντισώματα εμφανίζονται περίπου 5 μέρες μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων και, μαζί με τα IgG αντισώματα που προκύπτουν αργότερα, μπορεί να εντοπιστούν στον ορό έως και αρκετούς μήνες μετά. Αν και μια εξειδικευμένη real-time RT-PCR φαινομενικά είναι καλύτερη για την ανίχνευση του ιού, ο ορολογικός έλεγχος εξακολουθεί να είναι απαραίτητος και σημαντικός για τον εντοπισμό της λοίμωξης μετά το πέρας του ιαμικτού σταδίου, καθώς μια PCR κατά πάσα πιθανότητα θα δώσει αρνητικό αποτέλεσμα (Vazquez *et al.*, 2011).

#### 1.6.9 Πρόληψη και αντιμετώπιση του USUV

Επί του παρόντος, όπως προαναφέρθηκε, ο USUV είναι ενδημικός σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες και συνεχώς παρατηρείται η διάδοση αυτού του παθογόνου ιού σε νέες γεωγραφικές περιοχές. Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν την αυξανόμενη ανάγκη εφαρμογής και ενίσχυσης των κτηνιατρικών και εντομολογικών σχεδίων επιτήρησης του USUV στις ευρωπαϊκές χώρες, τα οποία μάλιστα μοιάζουν με εκείνα για τον ιό του Δυτικού Νείλου, ώστε να κατανοηθεί καλύτερα η γεωγραφική κατανομή, η οικολογία, η επιδημιολογία και η γενετική ποικιλότητα αυτού του ιού (Gaibani & Rossini, 2017). Ακόμη, καθίσταται αποδοτικό από πλευράς κόστους να γίνεται χρήση των δεδομένων που παράγονται από τα συστήματα επιτήρησης, ως δείκτης για το πότε πρέπει να ξεκινήσει και ο προληπτικός έλεγχος στις αιμοδοσίες (Calzolari *et al.*, 2012), ιδιαίτερα κατά τους θερινούς μήνες, κατά τους οποίους παρατηρείται εντονότερη δραστηριότητα των δυνητικών φορέων (Vazquez *et al.*, 2011).

Οι λοιμώξεις ανθρώπων θεωρούνται ακόμη σχετικά σποραδικές. Βέβαια, η περιορισμένη διαθεσιμότητα διαγνωστικών εξετάσεων, η υψηλή διασταυρούμενη

ορολογική αντιδραστικότητα μαζί με τη συν-κυκλοφορία με στενά συγγενείς φλαβοϊούς (π.χ. WNV), μπορεί να έχουν συμβάλει στην υπο-διάγνωση των μολύνσεων ανθρώπων από USUV (Gaibani & Rossini, 2017). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, ένας αυξανόμενος αριθμός αναφορών σχετικά με ανθρώπινες λοιμώξεις από τον USUV, ειδικά σε χώρες με ενεργό σχέδιο επιτήρησης για τον WNV, οδηγούν στην υπόθεση πως ο ρόλος του USUV ως ανθρώπινου παθογόνου παράγοντα είναι πιο σημαντικός από ότι θεωρούνταν μέχρι τώρα (Vazquez *et al.*, 2011). Βάσει αυτών των στοιχείων, σε χώρες όπου κυκλοφορεί ο ιός, θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα λοίμωξης από τον USUV σε ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους και νευρολογικές παθήσεις άγνωστης αιτιολογίας (Gaibani & Rossini, 2017).

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες για τη διερεύνηση της εξέλιξης ενός εμβολίου που θα μπορούσε να προστατεύσει από μολύνσεις του ιού Usutu. Παρότι ο εμβολιασμός μπορεί να θεωρηθεί ως μια αποτελεσματική στρατηγική για την πρόληψη της λοίμωξης από τον USUV, ο περιορισμένος αριθμός ανθρώπινων περιπτώσεων υποδηλώνει ότι προς το παρόν δεν υπάρχει επείγουσα ανάγκη για την ανάπτυξη τέτοιου εμβολίου (Gaibani & Rossini, 2017).

Συμπερασματικά, είναι αναγκαία η πληρέστερη γνώση της κινητικής της λοίμωξης από τον USUV στους ανθρώπους, όπως η ακριβής διάρκεια της ιαιμίας και ο ακριβής απαιτούμενος χρόνος για την ανίχνευση της ειδικής ανοσοαπόκρισης του ξενιστή, ώστε να κατανοηθεί καλύτερα ο παθογόνος ρόλος του USUV στους ανθρώπους (Gaibani & Rossini, 2017).

## **1.7 Ιός Toscana**

### **1.7.1 Γενικά στοιχεία για την εμφάνιση και την απομόνωση του ιού**

Ο ιός Toscana (Toscana Virus, TOSV) είναι ένας αρμποϊός που μεταδίδεται από σκνίπες και ανήκει στο γένος Phlebovirus της οικογένειας Phenuiviridae, η οποία με τη σειρά της κατατάσσεται εντός της τάξης Bunyavirales. Το γένος Phlebovirus περιλαμβάνει περίπου 40 αναγνωρισμένους ιούς οι οποίοι διανέμονται γεωγραφικά στην Ευρώπη, την Αφρική, την Κεντρική Ασία και την Αμερική. Μεταξύ των φλεβοϊών αυτών, δυο ιδιαίτερα σημαντικά είδη είναι ο ιός του πυρετού της Ρηξιγενούς Κοιλιάδας (Rift Valley Fever Virus, RVFV) και ο ιός του πυρετού εκ φλεβοτόμου (Sandfly Virus, SFV). Στην ομάδα SFV υπάρχουν κάποια στελέχη που κυκλοφορούν στην Ευρώπη, τα οποία ευθύνονται για την οξεία, αλλά μη θανατηφόρα, συμπτωματολογία που μοιάζει με γρίπη. Συγκεκριμένα, υπάρχουν τρεις κυκλοφορούντες ορότυποι: ο ιός του

πυρετού εκ φλεβοτόμου της Σικελίας (Sandfly Sicilian Virus, SFSV), ο ιός του πυρετού εκ φλεβοτόμου της Νάπολης (Sandfly Naples Virus, SFNV) και ο ιός Toscana. Οι ιοί της Σικελίας και της Νάπολης, εκτός από την Ευρώπη, έχουν έντονη παρουσία στην Κεντρική Ασία και τη Μέση Ανατολή (Valassina *et al.*, 2003).

Ο ιός Toscana απομονώθηκε αρχικά το 1971 από μια σκνίπα του είδους *Phlebotomus perniciosus* που συλλέχθηκε στο Monte Argentario, στην ευρύτερη περιοχή της Τοσκάνης, στην κεντρική Ιταλία. Αργότερα, το 1980, καταχωρήθηκε στον διεθνή κατάλογο των αρμφοϊών και αποδόθηκε στο γένος Phlebovirus (Valassina *et al.*, 2003; Charrel *et al.*, 2005). Άλλα στελέχη του ιού Toscana απομονώθηκαν από σκνίπες του είδους *Phlebotomus perfiliewi* σε άλλες περιοχές της Ιταλίας και από εγκεφάλους νυχτερίδων *Pipistrellus kuhli* που συλλήφθηκαν σε περιοχές όπου υπήρχαν οι αρθρώποδοι φορείς του ιού (Valassina *et al.*, 2003). Μετά την ανακάλυψή του στην Κεντρική Ιταλία, αποδείχθηκε ότι είναι ενδημικός σε αρκετές άλλες περιοχές της Ιταλίας, όπου και προκαλεί νευροδισευτικές λοιμώξεις κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Alkan *et al.*, 2013). Μετά το 2000, έγινε μάλιστα αντιληπτό ότι ο TOSV είχε πολύ μεγαλύτερο εύρος γεωγραφικής κατανομής από αυτό που αρχικά είχε εκτιμηθεί και είναι παρών στις περισσότερες χώρες της Δυτικής Ευρώπης που βρίσκονται στα βόρεια σύνορα της Μεσογείου, όπως η Πορτογαλία, η Ισπανία, η Γαλλία, η Ελλάδα και η Κροατία, καθώς και σε ανατολικές χώρες, όπως η Κύπρος και η Τουρκία. Στις χώρες που ενδημεί, ο TOSV συγκαταλέγεται στους τρεις πιο επικρατείς ιούς που προκαλούν μηνιγγίτιδα κατά τη διάρκεια των θερμών περιόδων, μαζί με τους εντεροϊούς και τους ερπητοϊούς (Charrel *et al.*, 2012; Papa & Papadopoulou, 2018). Δυστυχώς, μέχρι σήμερα, τα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν τη Βόρεια Αφρική και άλλες χώρες που βρίσκονται νότια της Μεσογείου είναι λίγα και αρκετά σπάνια (Charrel *et al.*, 2012). Πάντως, όλες οι μελέτες συμφωνούν σχετικά με τη μηνιαία κατανομή κρουσμάτων ανθρώπινων λοιμώξεων από τον TOSV. Ο υψηλότερος κίνδυνος μόλυνσης είναι τον Αύγουστο, έπειτα τον Ιούλιο και τον Σεπτέμβριο και τέλος τον Ιούνιο και τον Οκτώβριο. Οι πληθυσμοί που ζουν σε αγροτικές περιοχές, με υψηλά επίπεδα υπαίθριων δραστηριοτήτων, διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο από όλους (Charrel *et al.*, 2005).

#### 1.7.2 Φορείς και ξενιστές του TOSV

Ο ιός Toscana μεταδίδεται από σκνίπες του γένους *Phlebotomus*. Το γένος αυτό κατατάσσεται στη τάξη Diptera, ανήκει στην την οικογένεια Psychodidae, και συγκεκριμένα, στην υποοικογένεια Phlebotominae. Τα μέλη της οικογένειας Psychodidae διακρίνονται από μια πυκνή κάλυψη με λεπτές υφές σαν λέπια στο

κεφάλι, τον θώρακα και τα πόδια, καθώς και από εμφανείς φλέβες στα φτερά. Από τις πέντε υποοικογένειες, μόνο τα μέλη της Phlebotominae έχουν αρκετά αιχμηρή προβοσκίδα που να τους επιτρέπει να τραφούν με αίμα άλλων ζώων. Οι φλεβοτόμοι σκνίπες διαθέτουν αρκετά μικρό σώμα που σπάνια υπερβαίνει τα 1,5-3 mm και το χρώμα τους κυμαίνεται από σχεδόν λευκό έως σχεδόν μαύρο. Είναι κυρίως νυκτόβιες, αλλά μερικές μπορεί να τρέφονται και στο φως της ημέρας. Ακόμη, κατανέμονται σε όλο τον κόσμο, σε τροπικές και υποτροπικές, άνυδρες και ημι-άνυδρες περιοχές, καθώς και σε εύκρατες ζώνες. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά τρέφονται με πηγές ζάχαρης στην άγρια φύση, αλλά μόνο τα θηλυκά τρέφονται με αίμα πριν από την εναπόθεση των αυγών τους σε χερσαία μικροπεριβάλλοντα, πλούσια σε οργανική ύλη όπως το έδαφος και τα λαγούμια, η οποία χρησιμεύει ως θρεπτική ουσία για τις προνύμφες των φλεβοτόμων (Alkan *et al.*, 2013). Ανά τα χρόνια, ο TOSV έχει απομονωθεί επανειλημμένα από σκνίπες του είδους *P. perniciosus* και *P. Perfiliewi*, αλλά ποτέ από το είδος *P. papatasi*. Το είδος *P. perniciosus* κατανέμεται σε όλη την περιοχή της Μεσογείου και χωρίζεται σε δύο φυλές (Charrel *et al.*, 2012). Η κοινότητα φυλή εμφανίζεται κυρίως στην Ιταλία και σε περιοχές όπως η Μάλτα, η Τυνησία και το Μαρόκο, ενώ η ιβηρική φυλή στην νότια Ισπανία (Charrel *et al.*, 2005). Εκτός από τα δύο αυτά είδη, ο TOSV μπορεί να μεταδοθεί από σκνίπες που ανήκουν σε είδη όπως το *P. neglectus* στα Βαλκάνια, το *P. sergenti* στο Μαρόκο και το *Sergentomyia minuta* στη Γαλλία (Charrel *et al.*, 2018).

Για τα ζώα ξενιστές ως δεξαμενές λίγα είναι γνωστά. Ως τώρα, ούτε άγρια θηλαστικά ούτε πτηνά έχουν αναγνωριστεί ως δεξαμενές του ιού Toscana, αν και οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί είναι λίγες προκειμένου να υπάρχει μια σαφή ιδέα πάνω στο θέμα. Μεταξύ των ζώων στα οποία έχει τεκμηριωθεί η λοίμωξη από τον ιό Toscana είναι οι κατσίκες, οι αγελάδες, τα γουρούνια, τα πρόβατα, οι σκύλοι, οι γάτες και τα άλογα (Alkan *et al.*, 2013). Ακόμη, παρόλο που έχουν απομονωθεί αρκετοί φλεβοϊοί από το αίμα ασθενών και από διάφορα άγρια ζώα, η γενικότερη σημασία των σπονδυλωτών ξενιστών για τη διατήρηση του κύκλου ζωής αυτών των μολυσματικών παραγόντων εξακολουθεί να παραμένει ασαφής. Το παρόν δόγμα είναι ότι το κατάλληλο είδος φλεβοτόμου σκνίπας μπορεί να είναι ταυτόχρονα ο φορέας και η δεξαμενή του TOSV. Ωστόσο, τα στοιχεία είναι λίγα και απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για να επιβεβαιωθεί ή να αντικρουστεί αυτή η υπόθεση (Charrel *et al.*, 2012).

### 1.7.3 Περιοχές που ενδημεί και εμφανίζεται ο TOSV

Μια ορολογική μελέτη για την παρουσία αντισωμάτων ενάντια στον ιό του πυρετού εκ φλεβοτόμου της Σικελίας (SFSV), τον ιό του πυρετού εκ φλεβοτόμου της



Νάπολης (SFNV) και τον ιό Toscana, έδειξε ότι, οι ιϊκές μολύνσεις από τους SFSV και SFNV μειώθηκαν ή εξαφανίστηκαν μετά τη δεκαετία του 1940 σε χώρες που πραγματοποιούνταν ψεκασμοί στα πλαίσια εξάλειψης της ελονοσίας. Αντίθετα, ο ιός Toscana εξακολουθεί να παρατηρείται ετησίως σε όλες αυτές τις περιοχές της Μεσογείου και συγκεκριμένα, είναι παρών σε χώρες όπου ενδημούν και οι φορείς του, οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* (Valassina *et al.*, 2003).

Μέχρι στιγμής, οι περισσότερες κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν διεξαχθεί στην Ιταλία, παρόλο που πρόσφατα έχουν δημοσιευθεί μελέτες και από άλλες μεσογειακές χώρες. Σύμφωνα με αυτές, ο ιός Toscana είναι ενδημικός, στην Ιταλία, την Ισπανία, την Γαλλία, την Πορτογαλία, την Τουρκία, την Κροατία, την Κύπρο και την Ελλάδα. Αναλυτικότερα, στην Ιταλία τα μέσα ποσοστά οροθετικότητας για τον TOSV κυμαίνονται από 30% έως 50%, με κάποιες περιοχές να ξεπερνούν το 70%. Το αντίστοιχο ποσοστό στην Ισπανία είναι 26,2%, στην Κύπρο 20%, στην Τουρκία 15%, στην Γαλλία 12% και στην Πορτογαλία 5,6% (Charrel *et al.*, 2012; Alkan *et al.*, 2013). Ιδιαίτερα υψηλά είναι τα ποσοστά οροθετικότητας του Ελληνικού πληθυσμού, αγγίζοντας σε κάποιες περιοχές το 60% (Papa *et al.*, 2015 (α)). Συγκεκριμένα, στα νησιά του Ιονίου η μέση οροθετικότητα είναι 47,7%, με υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται σε ανθρώπους άνω των 60 ετών (Papa *et al.*, 2010) (Εικόνα 6). Στα νησιά του Αιγαίου το αντίστοιχο ποσοστό είναι 21%, με υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζουν η Σάμος (40%) και η Εύβοια (34,8%), ακολουθούμενες από την Κρήτη (22%), τη Σύρο (20%), τη Λέσβο (17,6%) και τη Ρόδο (11,5%) (Anagnostou & Papa, 2013 (α)) (Εικόνα 6). Η βόρεια Ελλάδα εμφανίζει μέση οροθετικότητα στο 11,26%. Συγκεκριμένα, υψηλότερα ποσοστά σημειώθηκαν στην βορειοανατολική Ελλάδα (14,48%), και ιδιαίτερα στους νομούς Ξάνθης (23,52%), Έβρου (21,42%), Ροδόπης (16,66%) και Δράμας (16%). Σχετικά υψηλά ποσοστά σημειώθηκαν και στην κεντρική βόρεια Ελλάδα (12,37%), στους νομούς Σερρών (19,29%), Θεσσαλονίκης (18,30%) και Χαλκιδικής (18,18%) (Anagnostou & Papa, 2013 (β)) (Εικόνα 7).

Εκτός από τις χώρες και τις περιοχές που αναφέρθηκαν ως τώρα, επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες υποδεικνύουν την παρουσία του ιού Toscana και σε κάποιες ακόμα περιοχές των Βαλκανίων και της Μεσογείου, όπως είναι η Βοσνία-Ερζεγοβίνη, το Κόσοβο, η Μάλτα, καθώς και χώρες της βόρειας και κεντρικής Αφρικής, όπως το Μαρόκο, η Τυνησία και η Αλγερία (Alkan *et al.*, 2013; Charrel *et al.*, 2018). Δυστυχώς όμως, προς το παρόν δεν είναι εντελώς ξεκάθαρη η έκταση της εξάπλωσής του σε αυτά τα μέρη. Σίγουρα, η συλλογή επιπλέον ορολογικών και μοριακών δεδομένων θα βοηθήσουν πολύ στην εξακρίβωση της κυκλοφορίας και της μετάδοσης του ιού σε αυτές τις γεωγραφικές περιοχές. Ακόμη, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι φλεβοτόμοι σκνίπες καταλαμβάνουν μια σταδιακά διευρυνόμενη γεωγραφική

περιοχή, πιθανώς λόγω των κλιματικών αλλαγών, είναι πλέον επιθυμητό να διεξαχθούν μελέτες σχετικά με τον ΤΟSV και σε περιοχές της Ευρώπης που βρίσκονται βόρεια του ιστορικού ορίου κυκλοφορίας των φορέων του ιού (Charrel *et al.*, 2012).

Εικόνα 6: Ποσοστά οροθετικότητας για τον ιό Toscana σε νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου πελάγους (Anagnostou & Papa, 2013 (α))

Εικόνα 7: Ποσοστά οροθετικότητας για τον ιό Toscana στη βόρεια Ελλάδα (Anagnostou & Papa, 2013 (β))

#### 1.7.4 Περιστατικά μόλυνσης από TOSV σε ανθρώπους

Η πρώτη απόδειξη της παθογονικότητας του TOSV για τον άνθρωπο, και συγκεκριμένα της τάσης του να προκαλεί λοιμώξεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), προήλθε στα μέσα της δεκαετίας του 1980 από δύο ταξιδιώτες που εμφάνισαν συμπτώματα μόλυνσης αφού επέστρεψαν στην πατρίδα τους. Συγκεκριμένα, επρόκειτο για ένα Σουηδό και έναν Αμερικάνο που είχαν επισκεφθεί την Πορτογαλία και την Ιταλία αντίστοιχα. Στη συνέχεια, η απομόνωση του ιού Toscana από μια γυναίκα στην Ιταλία με άσηπτη μηνιγγίτιδα, επιβεβαίωσε ότι ο ιός είναι σημαντικός αιτιώδης παράγοντας λοιμώξεων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Έκτοτε, έχουν γίνει πάρα πολλές αναφορές συγκεκριμένων περιπτώσεων μόλυνσης από τον ιό Toscana στην Ιταλία, αλλά και σε άλλες χώρες, όπως η Ισπανία, η Γαλλία, η Πορτογαλία, η Τουρκία, η Κροατία και η Ελλάδα, ενώ μεμονωμένες περιπτώσεις έχουν εντοπιστεί στη Βοσνία-Ερζεγοβίνη και τη Μάλτα (Alkan *et al.*, 2013). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της Σιένα, στην Ιταλία. Τα ευρήματά της έδειχναν ότι κατά την διάρκεια μιας μόνο θερινής περιόδου, το 81% των ασθενών που έπασχαν από μηνιγγίτιδα και άλλες λοιμώξεις του ΚΝΣ λόγω κάποιου ιού, ήταν μολυσμένοι από τον TOSV (Valassina *et al.*, 2003). Γενικότερα, ο πληθυσμός-στόχος του ιού προέρχεται κυρίως από γεωγραφικές περιοχές όπου ο ίδιος δεν είναι ενδημικός. Πρόκειται δηλαδή συνήθως για τουρίστες που επισκέπτονται μια ενδημική περιοχή του ιού. Οι περιπτώσεις λοιμώξεων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), είναι λιγότερο συχνές μεταξύ των ατόμων από ενδημικές ζώνες, πιθανώς λόγω της παρουσίας αντισωμάτων έναντι του TOSV που υπάρχουν στον ενήλικο πληθυσμό (Valassina *et al.*, 2003).

Στην περιοχή της Μεσογείου εκτιμάται ότι 250 εκατομμύρια άνθρωποι εκτίθενται στον TOSV, με ποσοστά οροθετικότητας υψηλότερα από 40% σε ορισμένες περιοχές (Charrel *et al.*, 2018). Όπως προαναφέρθηκε, τα ποσοστά του Ελληνικού πληθυσμού είναι από τα πιο υψηλά των Μεσογειακών χωρών και, μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί τέσσερα επιβεβαιωμένα περιστατικά λοίμωξης από τον ιό Toscana. Στις 30 Ιουνίου του 1993, μια 73χρονη γυναίκα έκανε εισαγωγή στη νευρολογική κλινική ενός νοσοκομείου της Γερμανίας και η αναδρομική ορολογική εξέταση που πραγματοποιήθηκε, αποκάλυψε αντισώματα IgM και IgG έναντι του ιού Toscana. Στη συνέχεια, η γυναίκα ανέφερε ότι είχε επισκεφθεί την Ελλάδα, και συγκεκριμένα το Λαύριο (60 χλμ. Νότια της Αθήνας), από τις 30 Μαΐου έως τις 18 Ιουνίου του 1993 (Dobler *et al.*, 1997). Αρκετά αργότερα, το καλοκαίρι του 2010, ένας νεαρός ηλικίας 20 ετών εισήχθη στο νοσοκομείο με πυρετό και λήθαργο. Κατοικούσε σε ένα χωριό 12 χλμ. δυτικά από τις Σέρρες, στην κεντρική Μακεδονία, και ανέφερε ότι δεν είχε

ταξιδέψει στο εξωτερικό. Στις εξετάσεις του νεαρού ανιχνεύθηκαν υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων IgM και IgG κατά του ιού Toscana στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ αρκετά χαμηλότεροι τίτλοι εμφανίστηκαν έναντι του ιού του πυρετού εκ φλεβοτόμου της Νάπολης (Para *et al.*, 2014 (α)). Στα τέλη Ιουνίου του 2012, μια πρότινος υγιής γυναίκα ηλικίας 49 ετών εισήχθη στην εντατική του Γενικού Νοσοκομείου Τρικάλων με σύγχυση και παραλήρημα. Λίγες ώρες πριν την είσοδό της, είχε μια μεγάλη επιληπτική κρίση ενώ πέντε ημέρες νωρίτερα, είχε παρουσιάσει γαστρεντερίτιδα και πυρετό (38°C). Η ασθενής ήταν κάτοικος του χωριού Γένεσι, 22 χλμ. δυτικά των Τρικάλων στην περιοχή της Θεσσαλίας. Η ίδια ανέφερε ότι δεν είχε ταξιδέψει στο εξωτερικό ή σε άλλη περιοχή της Ελλάδας. Η PCR για φλεβοϊούς είχε ως αποτέλεσμα ένα προϊόν του αναμενόμενου μεγέθους, η αλληλουχία του οποίου ήταν πιο στενά συνδεδεμένη με εκείνη των απομονωθέντων στελεχών που ανήκουν στο είδος του ιού του πυρετού εκ φλεβοτόμου της Νάπολης. Η αλληλουχία είχε επίσης την υψηλότερη ομολογία (85%) με ένα στέλεχος του ιού Toscana που ανήκε στη γενεαλογία C και που είχε εντοπιστεί πρώτη φορά σε έναν ασθενή με λοίμωξη του ΚΝΣ στην Κροατία το 2008. Στο δείγμα ορού που ελήφθη την ίδια ημέρα δεν υπήρχαν αντισώματα, αλλά ανιχνευτήκαν σε δείγμα που συλλέχθηκε λίγες μέρες αργότερα. Μετά από μερική σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου πολυμεράσης, διαπιστώθηκε ότι η γενεαλογία C του TOSV διέφερε από τις γενεαλογίες A και B κατά 29% και 30% αντίστοιχα. Επειδή, λοιπόν, εντοπίστηκε μια νέα παραλλαγή του TOSV στην Ελλάδα, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες τόσο για την απόκτηση ολόκληρης της γονιδιωματικής αλληλουχίας του ελληνικού στελέχους TOSV, όσο και για την αναγνώριση των φορέων του (Para *et al.*, 2014 (β)) (Εικόνα 8). Το τέταρτο περιστατικό λοίμωξης από τον ιό Toscana αφορά έναν άντρα 45 ετών που εισήχθη στο Γενικό Νοσοκομείο της Φλώρινας, στη βορειοδυτική Ελλάδα, τον Ιούλιο του 2013. Ήταν κάτοικος του χωριού Άγιος Γερμανός, κοντά στη λίμνη Πρεσπών, και δύο ημέρες πριν την εισαγωγή του εμφάνισε πυρετό, μυαλγία, αρθραλγία, ήπιο πονοκέφαλο και αιμορραγικό εξάνθημα. Στο δείγμα ορού που ελήφθη από τον ασθενή κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα της ασθένειας, ανιχνεύθηκαν υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων IgM και IgG έναντι του ιού Toscana, με χαμηλό τίτλο κατά του ιού του πυρετού εκ φλεβοτόμου της Νάπολης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο αιτιώδης παράγοντας ήταν ο TOSV ή άλλος φλεβοϊός με αντιγονική ομοιότητα. Ο ασθενής ανέφερε ότι πέντε ημέρες πριν από την εμφάνιση των συμπτωμάτων, ταξίδεψε από τη Γερμανία πίσω στην Ελλάδα, οδηγώντας μέσω Αυστρίας, Ουγγαρίας, Σερβίας και Βόρειας Μακεδονίας, διανυκτερεύοντας μάλιστα στη Σερβία (Para *et al.*, 2015 (β)).

Η προϋπάρχουσα ανοσία είναι σχεδόν βέβαιο ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον περιορισμό της ασθένειας που προκαλεί ο TOSV στη λεκάνη της Μεσογείου.

Παρόλα αυτά, η παθογένεια μπορεί να είναι υψηλότερη σε μη ανοσοποιημένους πληθυσμούς εκτός των περιοχών της τρέχουσας κυκλοφορίας του TOSV (Collao *et al.*, 2009). Τρανό παράδειγμα είναι οι πολυάριθμες περιπτώσεις λοιμώξεων Γερμανών τουριστών, οι οποίοι εμφανίζουν συμπτώματα επιστρέφοντας από ενδημικές περιοχές του ιού. Μάλιστα, επιδημιολογικές μελέτες στη Γερμανία στηρίζουν αυτήν την υπόθεση καθώς τα ποσοστά οροθετικότητας για τον TOSV φαίνεται να είναι πολύ χαμηλά έως μηδενικά (Charrel *et al.*, 2005). Έτσι, ο ιός πρέπει να θεωρείται απειλή για την ανθρώπινη υγεία και επιπλέον, τα προγράμματα έρευνας και επιτήρησης πρέπει να στοχεύουν στην αποτροπή της εξάπλωσής του σε νέες περιοχές (Collao *et al.*, 2009).

Εικόνα 8: Φυλογενετικό δέντρο που περιλαμβάνει το στέλεχος TOSV γενεαλογίας C που απομονώθηκε στην Ελλάδα (Para *et al.*, 2014 (β))

#### 1.7.5 Κλινική εικόνα του ιού Toscana

Ο ιός Toscana παρουσιάζει μια ιδιαίτερη νευροδισευδαιτικότητα, ένα χαρακτηριστικό που μοιράζεται με έναν μόνο ακόμα φλεβοϊό, τον ιό της Ρηξιγενούς Κοιλάδας (Rift Valley Fever Virus, RVFV) (Valassina *et al.*, 2003). Στην επιστημονική βιβλιογραφία δημιουργείται μια αντίθεση λόγω της έλλειψης ισορροπίας μεταξύ του αριθμού των περιπτώσεων οξείας λοίμωξης και των ποσοστών οροθετικότητας, τα οποία είναι χαμηλά και υψηλά αντίστοιχα. Αυτό υποδηλώνει ότι ένα σημαντικό μέρος των λοιμώξεων από τον TOSV, είτε είναι ασυμπτωματικό, είτε προκαλεί ήπια συμπτώματα που δεν δικαιολογούν την επίσκεψη σε κάποιον παθολόγο ή ειδικό λοιμωδών νόσων. Σε τέτοιες περιπτώσεις αποκλείεται η εργαστηριακή επιβεβαίωση με ειδικές ιολογικές δοκιμασίες, κάτι που οδηγεί σε πολύ μεγάλη υποτίμηση του αριθμού των μη νευροδισευδαιτικών μορφών μόλυνσης ανθρώπων από τον TOSV (Charrel *et al.*, 2012).

Η πιο τεκμηριωμένη κλινική μορφή της μόλυνσης από τον TOSV, όπως προαναφέρθηκε, αφορά λοιμώξεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Πρόκειται για περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι γενικά νοσηλεύονται και επομένως μπορούν να επωφεληθούν από την εργαστηριακή τεκμηρίωση του ρόλου του ιού Toscana στην εμφάνιση των συμπτωμάτων. Συνήθως, τα πρώτα συμπτώματα των νευροδισιδωτικών μολύνσεων είναι η κεφαλαλγία (100%), ο πυρετός (76% - 97%), η ναυτία και τάση προς έμετο (67% - 88%), καθώς και οι μυαλγίες (18%). Η φυσική εξέταση των ασθενών συχνά δείχνει δυσκαμψία του αυχένα (53% - 95%), δυσκαμψία του σημείου Kernig (γόνατο) (87%), προβλήματα στη συνείδηση (12%), τρόμο (2,6%), πάρεση (1,7%) και νυσταγμό (5,2%) (Charrel *et al.*, 2012). Εκτός αυτών, σπανιότερα έχουν αναφερθεί και άλλες νευρολογικές εκδηλώσεις όπως η εγκεφαλίτιδα, η οξεία μηνιγγιοεγκεφαλίτιδα, η κώφωση, οι επίμονες αλλοιώσεις της προσωπικότητας, η μακροχρόνια απώλεια συνείδησης σε συνδυασμό με επιληπτικές κρίσεις, ακόμη και περιπτώσεις θανατηφόρου εγκεφαλίτιδας. Σε κάποια βαριά περιστατικά καταγράφηκε ότι οι διαταραχές του λόγου και η πάρεση παρέμειναν για μήνες μετά την οξεία φάση της λοίμωξης (Alkan *et al.*, 2013). Γενικά, η μέση διάρκεια της νόσου είναι 7 ημέρες και το αποτέλεσμα είναι συνήθως ευνοϊκό. Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί ότι εάν δεν πραγματοποιηθούν ειδικές ιολογικές δοκιμασίες για την εργαστηριακή τεκμηρίωση του ιού που προκαλεί μηνιγγίτιδα σε κάποιον ασθενή, είναι αδύνατο να γίνει διάκριση της ιογενούς μηνιγγίτιδας από την μηνιγγίτιδα που οφείλεται σε άλλους παθογόνους παράγοντες αποκλειστικά βάσει των κλινικών συμπτωμάτων που εκδηλώνονται (Charrel *et al.*, 2012)

#### 1.7.6 Γενικά χαρακτηριστικά και μοριακή δομή του TOSV

Οι ιοί που ανήκουν στο γένος *Phlebovirus* παρουσιάζουν κοινά μοριακά και βιολογικά χαρακτηριστικά με αρκετούς ιούς της τάξης *Bunynavirales*. Συγκεκριμένα, έχουν μονόκλωνο αρνητικό γονιδίωμα RNA, το οποίο αντιπροσωπεύεται από τρία τμήματα, S (Small), M (Medium) και L (Large) (μικρό, μεσαίο και μεγάλο), διαθέτουν ένα περίβλημα που σχηματίζεται από τις γλυκοπρωτεΐνες G1 και G2, χαρακτηρίζονται από απουσία πρωτεΐνης M, μιας κατά τα άλλα κοινής πρωτεΐνης στους RNA ιούς, και τέλος ωριμάζουν σε ένα στάδιο στο επίπεδο της συσκευής Golgi, στο κύτταρο ξενιστή (Valassina *et al.*, 2003).

Τα ιϊκά σωματίδια του Toscana έχουν διάμετρο 80 έως 120 nm και αποτελούνται από ελικοειδή νουκλεοκαψίδια που περιέχουν το τριχοτομημένο γονιδίωμα. Το κάθε κομμάτι γονιδιώματος περικλείεται από μόρια νουκλεοπρωτεΐνης, μιας πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το τμήμα S, και συνδέεται με ένα μόριο ιϊκής

πολυμεράσης, μιας πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το τμήμα L. Τα τρία γονιδιωματικά τμήματα έχουν βραχείες, και ειδικές για το γένος *Phlebovirus*, αλληλουχίες στο 3' άκρο τους, οι οποίες είναι συμπληρωματικές με το 5' άκρο. Τα συμπληρωματικά αυτά κομμάτια, είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό δομών που μοιάζουν με πεπλατυσμένες θηλιές, οι οποίες πιθανώς συνδέονται και μεταξύ τους μέσα στο ιϊκό σωματίδιο. Αυτές οι δομές φαίνεται να είναι σημαντικές για τους μηχανισμούς μεταγραφής και αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος, καθώς και για την διαδικασία «συναρμολόγησης» νέων ιϊκών σωματιδίων (Valassina *et al.*, 2003).

Το τμήμα L (Large = Μεγάλο) των φλεβοϊών έχει μήκος 6400 - 6700 νουκλεοτιδίων και περιέχει ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) που, όπως προαναφέρθηκε, κωδικοποιεί την ιϊκή πολυμεράση ή αλλιώς πρωτεΐνη L. Η πρωτεΐνη L του ιού Toscana αποτελείται από 2095 αμινοξέα (239 kDa) και παρουσιάζει ισχυρή ομολογία στο κεντρικό τμήμα της με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ιού της Ρηξιγενούς Κοιλιάδας (Rift Valley Fever Virus, RVFV). Η συνολική ομολογία των δύο πρωτεϊνών είναι 37%, αλλά δεν κατανέμεται ομοιόμορφα. Η πιο συντηρημένη περιοχή βρίσκεται στο κεντρικό τμήμα του μορίου, καλύπτοντας τα αμινοξέα 650 έως 1600, με συνολική ομολογία 68%. Αυτός ο βαθμός συντήρησης θα μπορούσε να δείχνει ότι η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει το λειτουργικό κέντρο της, ενώ οι διαφορές στις τερματικές περιοχές θα μπορούσαν να αντανακλούν την εξελικτική απόκλιση των δύο ιών. Η σύγκριση της πρωτεΐνης L του ιού Toscana με τις διαθέσιμες αλληλουχίες των πολυμερασών άλλων ιών με αρνητικό γονιδίωμα RNA, δεν έδειξαν κάποιο βαθμό συντήρησης στα μέλη της οικογένειας *Phenuiviridae*. Αντίθετα, η ισχυρή ομολογία των πρωτεϊνών του ιού Toscana και του ιού της Ρηξιγενούς Κοιλιάδας, μαζί με τις ομοιότητες που παρουσιάζουν στη στρατηγική κωδικοποίησης των N πρωτεϊνών τους, υποδηλώνουν ότι αυτοί οι ιοί συνδέονται στενά στην εξέλιξή τους (Valassina *et al.*, 2003).

Για το τμήμα M (Medium = Μεσαίο) του ιού Toscana, μήκους 4215 νουκλεοτιδίων, έχει προταθεί ένα προϊόν γονιδίου 1339 αμινοξέων, με μοριακό βάρος περίπου 149 kDa και εννέα θέσεις γλυκοζυλίωσης. Το μοναδικό ORF του τμήματος M κωδικοποιεί τρεις πρωτεΐνες και συγκεκριμένα, την μη δομική πρωτεΐνη Nsm (Non-structural protein) (30 kDa) και δύο γλυκοπρωτεΐνες ίδιας μοριακής μάζας (65kDa), την G1 και την G2 (Glycoprotein 1 & 2). Η κωδικοποιούσα περιοχή μεταγράφεται και μεταφράζεται σε μια μοναδική πολυπρωτεΐνη που μεταμεταφραστικά επεξεργάζεται και διαχωρίζεται στις πρωτεΐνες Nsm, G1 και G2. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πολυπρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο M βρέθηκαν περιοχές ομολογίας με τις αντίστοιχες αλληλουχίες άλλων φλεβοϊών. Το προφίλ υδροφοβικότητας της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης M του TOSV έχει μία εντυπωσιακή ομοιότητα με εκείνο

άλλων φλεβοϊών, υποδηλώνοντας μια κοινή τοπολογία των τριών πρωτεϊνών Nsm, G1 και G2 στη μεμβράνη του ιϊκού σωματιδίου. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι πριν το αμινοτελικό άκρο κάθε γλυκοπρωτεΐνης προηγείται μία σειρά υδρόφοβων αμινοξέων. Ακόμη, μετά από στοίχιση της αλληλουχίας M του ιού Toscana με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του ιού της ρηξιγενούς κοιλάδας και του ιού Punta Toro, η έναρξη των γλυκοπρωτεϊνών G1 και G2 του TOSV τοποθετήθηκε εμπειρικά στα κατάλοιπα 297 και 936 του τμήματος M αντίστοιχα. Όπως και τα άλλα δύο γονιδιωματικά τμήματα του ιού, το τμήμα M φαίνεται να σχετίζεται με εκείνα άλλων φλεβοϊών, εκτός βέβαια από την περιοχή που κωδικοποιεί για τη μη δομική πρωτεΐνη Nsm. Οι μη δομικές πρωτεΐνες είναι οι πιο μεταβλητές μεταξύ των φλεβοϊών και πιθανά διαδραματίζουν έναν πολύ συγκεκριμένο ρόλο για τον καθένα. Αντίθετα, οι γλυκοπρωτεΐνες G1 και G2 φαίνεται να είναι υπεύθυνες για τις αλληλεπιδράσεις του ιού με το κύτταρο ξενιστή σε όλους τους φλεβοϊούς (Valassina *et al.*, 2003).

Τέλος, το γονιδιακό τμήμα S (Small = Μικρό), μήκους 1869 νουκλεοτιδίων, κωδικοποιεί τη νουκλεοπρωτεΐνη N (Nucleoprotein, N) (27kDa) και τη μη δομική πρωτεΐνη NS (Non-Structural protein, NS) (37kDa), μέσω μιας συγκεκριμένης διαδικασίας μεταγραφής και μετάφρασης που ορίζεται ως «αμφίσχημη». Συγκεκριμένα, ένα υπογονιδιακό mRNA, συμπληρωματικό με το μισό γονιδιωματικό τμήμα S ξεκινώντας από το 3' άκρο, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη N. Το άλλο μισό γονιδιωματικό τμήμα S, δηλαδή το κομμάτι που αντιστοιχεί στο 5' άκρο, κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες NS. Στους φλεβοϊούς, το κομμάτι μεταξύ των δύο ORF, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας βραχείας διαγονιδιακής περιοχής με πολυάριθμα ομοπολυμερή C, τα οποία γειτονεύουν με διατηρημένα εξανουκλεοτίδια GCTGCC. Τα mRNA του ιού Toscana για τις πρωτεΐνες N και NS καλύπτουν την ενδογενή περιοχή αυτή και αλληλεπικαλύπτονται περίπου κατά 80 κατάλοιπα. Επειδή τα mRNAs δεν είναι ενκαψιδωμένα, τα συμπληρωματικά 3' άκρα τους θα μπορούσαν να διευκολύνουν την *in vivo* πρόσδεσή τους. Αυτό θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της σταθερότητας των N και NS mRNA μορίων. Ορισμένες παραλλαγές στην κεντρική περιοχή της αλληλουχίας του τμήματος S υποδεικνύουν την κυκλοφορία ορισμένων παραλλαγών του ιού Toscana, αν και η σημασία αυτών των αλλαγών δεν έχει ακόμη καθοριστεί πλήρως (Valassina *et al.*, 2003).



#### 1.7.7 Γενετική ποικιλία και φυλογενετική του TOSV

Ο TOSV εμφανίζει μεγαλύτερη ποικιλία σε σχέση με άλλους καλά μελετημένους φλεβοϊούς. Η συγκέντρωση και σύγκριση δεδομένων από φυλογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον ιό, οδήγησαν στην εξαγωγή των παρακάτω συμπερασμάτων. Αρχικά, φαίνεται ότι όλα τα τμήματα S του ιού Toscana είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα. Από τα δύο γονίδια που κωδικοποιεί το τμήμα αυτό, το γονίδιο NS εμφανίζει μεγαλύτερη μεταβλητότητα σε σχέση με το γονίδιο N και, παρόλο που το ποσοστό νουκλεοτιδικής ποικιλίας είναι 12,1%, η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης είναι πλήρως διατηρημένη (100% ταυτότητα). Ακόμη, το τμήμα L εμφανίζει χαμηλότερο επίπεδο διατήρησης σε σχέση με το γονίδιο της πρωτεΐνης N, τόσο σε νουκλεοτιδικό όσο και σε αμινοξικό επίπεδο. Όσον αφορά στα γονιδιωματικά τμήματα M, είναι αυτά που εμφανίζουν τις μεγαλύτερες αποκλείσεις μεταξύ τους, ξεπερνώντας σε μεταβλητότητα και διάφορα στελέχη του ιού της Ρηξιγενούς Κοιλιάδας (Collao *et al.*, 2009).

Η γεωγραφική κατανομή μπορεί να είναι διαφορετική για κάθε γονότυπο του ιού Toscana. Συγκεκριμένα, ως τώρα, έχει παρατηρηθεί ότι στελέχη που ανήκουν στην γενεαλογία A του TOSV κυκλοφορούν κυρίως στην Ιταλία, τη Γαλλία και την Πορτογαλία. Αντίστοιχα, στελέχη της γενεαλογίας B κυκλοφορούν κυρίως στην Ισπανία, ενώ στελέχη της γενεαλογίας C έχουν βρεθεί μόνο στην Κροατία και την Ελλάδα. Οι γεωγραφικές διαφορές στην κατανομή του κάθε γονότυπου μπορεί να σχετίζονται και με διαφορές στη κατανομή των αρμυροϊκών φορέων του ιού (Collao *et al.*, 2009; Para *et al.*, 2014 (β)) (Εικόνα 9). Μέχρι σήμερα, τα δεδομένα αλληλούχησης ιικών στελεχών Toscana είναι δυστυχώς πολύ σποραδικά και σπάνια, κάτι που δεν επιτρέπει την εκτέλεση πιο εκτεταμένων φυλογενετικών αναλύσεων. Επομένως, είναι αναγκαίο να δημιουργηθεί ένα πρόγραμμα πλήρους αλληλούχησης των γονιδιωμάτων ιικών στελεχών που συλλέγονται σε διαφορετικές περιοχές και, ταυτόχρονα, να αναπτυχθούν προγράμματα απομόνωσης ιών σε όλες τις χώρες που περιβάλλουν τη Μεσόγειο, εκεί δηλαδή όπου κυκλοφορούν οι φορείς του TOSV. Έτσι θα κατανοηθεί καλύτερα η γενετική ποικιλιότητα των στελεχών, οι φυλογενετικές τους σχέσεις καθώς και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εξέλιξή τους (Charrel *et al.*, 2005).

Εικόνα 9: Γεωγραφική κατανομή ιϊκών στελεχών Toscana που ανήκουν στις γενεαλογίες A, B και C (Charrel *et al.*, 2018)

#### 1.7.8 Ανίχνευση, διάγνωση και κινητική του TOSV

Η κλινική εκδήλωση μηνιγγίτιδας από τον ιό Toscana δε διαφέρει από εκείνη που προκαλείται από άλλους ιϊκούς και μη μολυσματικούς παράγοντες. Επομένως, δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί μια χαρακτηριστική συμπτωματολογία για νευρολογικές λοιμώξεις αποκλειστικά για τον TOSV. Έτσι λοιπόν, είναι απαραίτητη μια αποτελεσματική και γρήγορη διαγνωστική προσέγγιση, με στόχο την ταχεία αναγνώριση του εκάστοτε ιϊκού παράγοντα, προκειμένου να αποκλειστούν τα βακτήρια για τα οποία μια αντιβιοτική θεραπεία θα ήταν αποτελεσματική (Valassina *et al.*, 2003).

Η λοίμωξη TOSV μπορεί να διαγνωστεί με την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων, με την ανίχνευση ιϊκού RNA γονιδιώματος ή και με απομόνωση του ιού σε κυτταρική καλλιέργεια. Η ορομετατροπή και η ανίχνευση IgG, IgM αντισωμάτων, ή και των δύο, μπορεί να επιτευχθεί σε κύτταρα μολυσμένα με TOSV μέσω ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ή μέσω άλλων δοκιμών ανοσοφθορισμού, με χρήση ειδικών αντιγόνων. Ωστόσο, είναι γεγονός ότι υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των μελών του γένους Phlebovirus και συγκεκριμένα μεταξύ του TOSV και άλλων οροτύπων του ιού του πυρετού εκ φλεβοτόμου της Νάπολης. Στις περιπτώσεις, λοιπόν, που πρέπει να επιβεβαιωθεί το

είδος του ιού, η δοκιμή εξουδετέρωσης πλάκας (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT) είναι η δοκιμή επιλογής. Εδώ και κάποια χρόνια, έχει αναπτυχθεί μια δοκιμή ELISA με βάση ένα γονίδιο ανασυνδυασμένης νουκλεοπρωτεΐνης N του TOSV και είναι διαθέσιμη στο εμπόριο από μια ιταλική εταιρεία (Charrel *et al.*, 2005).

Η άμεση διάγνωση βασίζεται στην απομόνωση του ιού ή τη μοριακή ανίχνευση του ιϊκού γονιδιώματος. Η απομόνωση του ιού και η μοριακή ανίχνευση από κλινικά δείγματα μπορεί να επιτευχθεί κυρίως με τη χρήση δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), τα οποία συλλέγονται κατά το οξύ στάδιο της λοίμωξης (πρώτες 2-4 ημέρες), και σπανιότερα από δείγματα αίματος και ορού. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα σχετικά χαμηλά επίπεδα κυκλοφορίας του ιού στον οργανισμό εμποδίζουν τις προσπάθειες απομόνωσής του. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι πιο ευαίσθητες από την ανίχνευση IgM ή την απομόνωση του ιού. Μέχρι πρόσφατα, όλες οι μελέτες που στόχευαν στη μοριακή ανίχνευση αλληλουχιών TOSV στο ENY ασθενών με μηνιγγίτιδα ή άλλες λοιμώξεις του ΚΝΣ, χρησιμοποιούσαν κλασσικές μεθόδους PCR, και ιδιαίτερα πρωτόκολλα εμφωλιασμένης PCR (nested PCR) (Charrel *et al.*, 2005). Πλέον, υπάρχουν εξειδικευμένες δοκιμές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) που έχουν μειώσει δραματικά τον κίνδυνο επιμολύνσεων, έχουν μειώσει πολύ τον απαιτούμενο χρόνο για την λήψη αποτελεσμάτων και ταυτόχρονα, έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με παλαιότερα πρωτόκολλα (Pérez-Ruiz *et al.*, 2007; Weidmann *et al.*, 2008). Ωστόσο, για να αναπτυχθούν δοκιμασίες real time PCR οι οποίες θα μπορούν να ανιχνεύουν όλες τις παραλλαγές του TOSV που κυκλοφορούν στις μεσογειακές χώρες και προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους, πρέπει να γίνει σημαντική προεργασία για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών των στελεχών που αντικατοπτρίζουν την ετερογένεια του ιού που έχει παρατηρηθεί. Ακόμη, αν και είναι γνωστό ότι η απομόνωση του ιού έχει χαμηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με την PCR, ο περιορισμένος αριθμός απομονωμένων στελεχών TOSV δικαιολογεί την προσπάθεια απομόνωσης όποτε αυτή είναι δυνατή, ώστε να ενισχυθεί η καλύτερη κατανόηση της γενετικής και αντιγονικής ποικιλομορφίας του ιού (Charrel *et al.* 2012).

Υπολογίζεται ότι η περίοδος επώασης του ιού στον οργανισμό κυμαίνεται από λίγες μέρες έως 2 εβδομάδες. Κατά το διάστημα αυτό ο ιός είναι ανιχνεύσιμος με μοριακές μεθόδους που στοχεύουν στον εντοπισμό του ιϊκού γονιδιώματος, ενώ η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων είναι λιγότερο πιθανή, ειδικά τις πρώτες μέρες που ακολουθούν την αρχική λοίμωξη. Τα IgM αντισώματα εμφανίζονται περίπου 3-4 μέρες μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων και μπορούν να εντοπιστούν στον ορό έως και 6 μήνες μετά. Τα IgG αντισώματα προκύπτουν είτε ταυτόχρονα με τα IgM, είτε

1-2 μέρες αργότερα, και μπορούν να εντοπιστούν στον ορό έως 2 χρόνια αργότερα. Αν και μια εξειδικευμένη real-time RT-PCR φαινομενικά είναι καλύτερη για την ανίχνευση του ιού, ο ορολογικός έλεγχος εξακολουθεί να είναι απαραίτητος και σημαντικός για τον εντοπισμό της λοίμωξης μετά το πέρας του ιαμικού σταδίου, καθώς δεν επηρεάζεται από την βιωσιμότητα του ιού (Pierro *et al.*, 2017).

#### 1.7.9 Πρόληψη και αντιμετώπιση του TOSV

Ο ιός Toscana, όπως προαναφέρθηκε, είναι ενδημικός σε πολλές χώρες και, παρά τις αδιαμφισβήτητες αποδείξεις ότι η γεωγραφική περιοχή στην οποία κυκλοφορεί είναι αρκετά μεγαλύτερη από ότι θεωρούνταν αρχικά, ο TOSV παραμένει ένα παραμελημένο ανθρώπινο παθογόνο, με ελάχιστους γιατρούς να έχουν επίγνωση της δυνατότητας του ιού να προκαλεί λοιμώξεις του ΚΝΣ (Charrel *et al.* 2012). Η γεωγραφική εξάπλωση του ιού Toscana, καθώς και άλλων φλεβοϊών που μεταδίδονται με την βοήθεια φλεβοτόμων σκνιπών, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γεωγραφική κατανομή αυτών των αρμυροϊκών φορέων, οι οποίοι με τη σειρά τους επηρεάζονται σημαντικά από τις κλιματικές αλλαγές και τις περιβαλλοντικές τροποποιήσεις. Ακόμα και στα αισιόδοξα σενάρια, η επικείμενη κλιματική αλλαγή κατά πάσα πιθανότητα θα οδηγήσει στην αύξηση των θερμοκρασιών του αέρα. Στο τέλος αυτού του αιώνα, ο αριθμός των ζεστών ημερών στην Κεντρική Ευρώπη προβλέπεται να φτάσει τις συνθήκες που επικρατούν σήμερα στη νότια Ευρώπη, ενώ οι καλοκαιρινές βροχοπτώσεις αναμένεται να αυξηθούν στα βορειοανατολικά μέρη της ηπείρου και πιθανά θα μειωθούν στο νότο. Αυτές οι κλιματικές μεταβολές μπορεί να υποστηρίξουν την εξάπλωση του TOSV, μέσω της διεύρυνσης της κατανομής των φορέων του (Alkan *et al.*, 2013). Επιπλέον, δεδομένου ότι πολλοί άνθρωποι ταξιδεύουν στα πλαίσια τουρισμού, ιδιαίτερα σε εξωτικές, θερμότερες τοποθεσίες, όπως για παράδειγμα είναι η λεκάνη της Μεσογείου, πρέπει να εξεταστεί ο κίνδυνος εισαγωγής του TOSV σε μη ενδημικές χώρες μέσω αυτής της οδού. Αυτό αφορά περισσότερο τους ηλικιωμένους ανθρώπους που συχνά έχουν περισσότερο χρόνο να ταξιδέψουν και ταυτόχρονα, αποτελούν την πιο ευάλωτη ηλικιακή ομάδα (Veater *et al.*, 2017).

Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν διαθέσιμα εγκεκριμένα εμβόλια ή ειδικές αντιϊκές θεραπείες για τις ασθένειες που προκαλούνται από τον TOSV. Είναι όμως σημαντικό να εξεταστούν τα αντίμετρα κατά του ιού στα πλαίσια πρόληψης (Alkan *et al.*, 2013). Αρχικά, επειδή τα δεδομένα σχετικά με την κυκλοφορία του TOSV στις μεσογειακές χώρες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού προκαλούν ανησυχίες σχετικά με πιθανές επιπτώσεις στις αιμοδοσίες, είναι σημαντικό να γίνεται προληπτικός έλεγχος για πιθανές επιμολύνσεις, στον βαθμό που αυτό είναι δυνατό (Charrel *et al.*,

2005). Οι κυριότερες, ωστόσο, επιλογές είναι τα εντομοαπωθητικά και τα εντομοκτόνα. Οι εκστρατείες ψεκασμού συνήθως επικεντρώνονται σε κατοικημένες περιοχές, όμως χωρίς την ακριβή χαρτογράφηση των οικοτόπων των αρμποιϊκών φορέων και των περιοχών αναπαραγωγής τους, ο ψεκασμός είναι πιθανό να μην είναι αποτελεσματικός. Ακόμη, το ίδιο αναποτελεσματικές θεωρούνται και οι χρονικά σποραδικές εκστρατείες. Εκτός από τα εντομοκτόνα, υπάρχουν μερικές καινοτόμες βιώσιμες προσεγγίσεις, όπως τα δολώματα φερομονών και η καλλιέργεια βλαβερών φυτών για τις σκνίπες. Μία άλλη, πιο πρακτική λύση, είναι οι κουνουπιέρες, οι σίτες και οι εμποτισμένες με εντομοκτόνο κουρτίνες (Alkan *et al.*, 2013).

Η ανάπτυξη ενός εμβολίου ενάντια στον ιό Toscana έχει νόημα περισσότερο για στρατιωτικές μονάδες που υπηρετούν σε ενδημικές περιοχές, για άτομα που ταξιδεύουν σε αυτές και φυσικά για τις ευάλωτες ομάδες πληθυσμού που ζουν εκεί. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα επιστημονικά δεδομένα, θα ήταν πιο συμφέρον να δημιουργηθεί ένα τριπλό εμβόλιο που να παρέχει προστασία ενάντια και στους τρεις ιούς της ορομάδας του πυρετού εκ φλεβοτόμου, δηλαδή τον ιό του πυρετού εκ φλεβοτόμου της Νάπολης, της Σικελίας και τον Toscana (Alkan *et al.*, 2013).

Παρόλο που ο ιός Toscana είναι ο πιο διαδεδομένος αρμποιϊός στην Ευρώπη και έχει ανακαλυφθεί εδώ και 50 χρόνια, υπάρχουν λιγότερες από 300 αναφορές που περιέχουν τη λέξη-κλειδί «Toscana virus» στις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων. Συγκρίνοντας για την ίδια χρονική περίοδο (1971-2019) τις αναφορές για τους ιούς West Nile, Zika και Chikungunya, υπάρχουν περίπου 6500, 3360 και 3000 αναφορές αντίστοιχα. Είναι, λοιπόν, αδιαμφισβήτητο γεγονός ότι το TOSV παραμένει ένα παραμελημένο παθογόνο και αυτό είναι κάτι που πρέπει να αλλάξει (Charrel *et al.*, 2018).

## **1.8 Διάγνωση ιών**

Οι ιοί, όπως ο Usutu και ο Toscana, είναι πολύ μικροί για να μπορεί κανείς να τους δει σε ένα απλό μικροσκόπιο. Αντ' αυτού, πρέπει να γίνει χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, κάτι που απαιτεί ιικές συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα 10<sup>11</sup> σωματίδια ανά ml, ή και υψηλότερες αν ο ιός δεν έχει κάποια διακριτή μορφολογία, έναν πολύ καλό εξοπλισμό, καθώς και έναν εξειδικευμένο χειριστή. Έτσι οι ιοί ανιχνεύονται συνήθως με άλλες μεθόδους, τόσο σε επίπεδο έρευνας όσο και διάγνωσης, οι οποίες εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό του ιού σε ένα κατάλληλο σύστημα καλλιέργειας και την επικήμενη ανίχνευσή του βάση των επιπτώσεων που επιφέρει. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ορολογικές μεθόδους, οι οποίες εκμεταλλεύονται την αλληλεπίδραση

μεταξύ ενός ιού και των ειδικών αντισωμάτων εναντίον του, και τέλος, η τρίτη κατηγορία βασίζεται στην ανίχνευση του ιϊκού νουκλεϊκού οξέος με μοριακές μεθόδους (Dimmock *et al.*, 2016). Παρακάτω αναφέρονται λίγο πιο αναλυτικά κάποιες από αυτές τις μεθόδους, οι οποίες μάλιστα, χρησιμοποιούνται ευρέως για την διάγνωση των ιών Usutu και ο Toscana.

#### 1.8.1 Απομόνωση και καλλιέργεια ιών

Το σύστημα καλλιέργειας για την ανάπτυξη ενός ιού αποτελείται πάντα από ζώντα κύτταρα. Η επιλογή του συστήματος καλλιέργειας εξαρτάται από τους στόχους του εκάστοτε πειράματος, αλλά και από τον ίδιο τον ιό. Με βάση τον ορισμό της λέξης, η ασθένεια μπορεί να μελετηθεί σωστά μόνο σε ολόκληρο τον οργανισμό, και κατά προτίμηση στον φυσικό ξενιστή του παθογόνου. Ωστόσο, αυτό σαν ενδεχόμενο αποκλείεται για τους ανθρώπους, τόσο για λόγους ηθικής, όσο και ασφάλειας. Εναλλακτικά, λοιπόν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες οργάνων και κυττάρων. Ο συνήθης τρόπος ανίχνευσης της παρουσίας ενός ιού σε μολυσμένα κύτταρα είναι από την παθολογία που προκαλεί σε αυτά, γνωστή και ως κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα (Cytopathic Effect, CPE). Συχνά ένας ιός, ή μια ομάδα συγγενικών ιών, μεταβάλλουν τη μορφολογία των κυττάρων με ένα χαρακτηριστικό τρόπο και αυτό μπορεί να αναγνωριστεί με την απλή παρατήρηση της κυτταρικής καλλιέργειας σε μικροσκόπιο. Κατά την απομόνωση ενός άγνωστου ιού, ένα τέτοιο κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα δίνει μια εξαιρετική ένδειξη ως προς το ποιά περαιτέρω, πιο συγκεκριμένα διαγνωστικά τεστ πρέπει να χρησιμοποιηθούν (Dimmock *et al.*, 2016).

#### 1.8.2 Ορολογικές μέθοδοι διάγνωσης

Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα των ανώτερων σπονδυλωτών ως απόκριση σε ξένα σώματα, ή αλλιώς αντιγόνα, τα οποία έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα αυτού. Τέτοια αντισώματα έχουν μια περιοχή που αναγνωρίζει και δεσμεύεται ειδικά με το εκάστοτε αντιγόνο. Μετά την παραγωγή τους, εκκρίνονται στα σωματικά υγρά και, πιο εύκολα, μπορούν να απομονωθούν από το αίμα. Το αίμα αφήνεται να πήξει και τα αντισώματα παραμένουν στο υγρό μέρος που παραμένει αφότου η διαδικασία θρόμβωσης έχει απομακρύνει τα κύτταρα και τις πρωτεΐνες πήξης, δηλαδή στον ορό (Dimmock *et al.*, 2016).

#### 1.8.2.1 Δοκιμή εξουδετέρωσης πλάκας (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT)

Εάν ένα αντίσωμα αναγνωρίσει και δεσμεύσει έναν ιό, η μολυσματικότητα αυτού θα ανασταλεί. Σε αυτήν την αρχή βασίζεται η δοκιμή εξουδετέρωσης πλάκας (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT). Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του τίτλου των ανασταλτικών αντισωμάτων ενάντια σε έναν ιό. Το δείγμα ορού, ή το εκάστοτε διάλυμα αντισωμάτων προς έλεγχο, αραιώνεται και αναμιγνύεται με ιϊκό εναιώρημα και επωάζεται μαζί με αυτό, προκειμένου να μπορέσει το αντίσωμα να αντιδράσει με τον ιό. Στη συνέχεια το μείγμα χύνεται μέσα σε ένα τρυβλίο, πάνω από μια μονοστιβάδα κυττάρων ξενιστή. Ακολουθώντας, η επιφάνεια του κυτταρικού στρώματος καλύπτεται από άγαρ ή καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη για να αποτραπεί η διάδοση του ιού αδιακρίτως. Η συγκέντρωση των μονάδων που σχηματίζουν πλάκες μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας τον αριθμό των πλακών, δηλαδή των περιοχών με μολυσμένα κύτταρα που σχηματίζονται μετά από μερικές ημέρες. Ανάλογα με τον ιό, οι μονάδες σχηματισμού πλάκας μπορούν να μετρηθούν είτε με παρατήρηση στο μικροσκόπιο, είτε με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων, είτε με ειδικές βαφές που αντιδρούν με τα μολυσμένα κύτταρα. Η συγκέντρωση του ορού που επιτυγχάνει τη μείωση του αριθμού των πλακών κατά 50% σε σύγκριση με το ιϊκό διάλυμα χωρίς ορό, αποκαλύπτει την ποσότητα των αντισωμάτων στο κλινικό δείγμα, καθώς και την αποτελεσματικότητά τους. Η μέθοδος PRNT θεωρείται από τις καλύτερες ορολογικές διαγνωστικές δοκιμές καθώς έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από πολλές άλλες, χωρίς μάλιστα να επηρεάζεται η ειδικότητά της. Το αρνητικό στοιχείο της είναι ότι απαιτεί κάποιες μέρες να ολοκληρωθεί και έτσι τα αποτελέσματα δεν είναι άμεσα και γρήγορα (Schmidt *et al.*, 1976).

#### 1.8.2.2 Δοκιμή αιμοσυγκόλλησης και αναστολής αιμοσυγκόλλησης (Hemmagglutination and Hemmagglutination inhibition assay)

Η μολυσματικότητα είναι μόνο μία από τις πολλές ιδιότητες του ιού που μπορούν να επηρεαστούν από τη δέσμευση ειδικών αντισωμάτων. Μια άλλη ιδιότητα που επηρεάζεται, είναι η συγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος από τον παθογόνο ιό. Αυτή είναι μια ιδιότητα ορισμένων ιών που προσκολλώνται σε μόρια της επιφάνειας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε μια συγκεκριμένη αναλογία ιού προς κύτταρο, τα ερυθρά αιμοσφαίρια συνδέονται μεταξύ τους μέσω των ιών που έχουν στην επιφάνειά τους και συγκολλούνται, συσσωματώνονται δηλαδή μαζί. Αυτό δεν έχει καμία σχέση με τη μολυσματικότητα του ιού. Μάλιστα, όταν η μολυσματικότητα ενός ιού έχει απενεργοποιηθεί εσκεμμένα, ο ιός αυτός εξακολουθεί να μπορεί να

συγκολλήσει αποτελεσματικά τα ερυθροκύτταρα, υπό την προϋπόθεση ότι οι επιφανειακές του ιδιότητες είναι άθικτες. Μια ποσοτική δοκιμή αιμοσυγκόλλησης πραγματοποιείται με την παρασκευή αραιώσεων του ιού σε ένα κατάλληλο τρυβλίο πολλαπλών θέσεων και εν συνεχεία, με την προσθήκη μιας πρότυπης ποσότητας ερυθρών αιμοσφαιρίων σε κάθε θέση. Η ποσότητα του υπάρχοντος ιού υπολογίζεται ως η αραιώση στην οποία ο ιός προκαλεί συγκόλληση στο 50% των ερυθροκυττάρων. Αυτή η δοκιμή έχει το πλεονέκτημα της ταχύτητας, σε σύγκριση με έναν μέσο όρο 3 ημερών που απαιτεί η μέθοδος PRNT, καθώς χρειάζεται μόλις 30 λεπτά για να ολοκληρωθεί. Ωστόσο, δεν είναι τόσο ευαίσθητη. Στη δοκιμή αναστολής αιμοσυγκόλλησης προστίθεται μικρή ποσότητα ιού σε σειριακές αραιώσεις αντισώματος πριν την προσθήκη στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η παρεμπόδιση της συγκόλλησης υποδεικνύει ότι το αντίσωμα έχει δεσμευθεί σε ένα σωματίδιο του ιού και, ως εκ τούτου, αναγνωρίζεται ο ιός. Η δοκιμή αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί, είτε με ένα γνωστό αντίσωμα για την ταυτοποίηση ενός άγνωστου ιού, είτε χρησιμοποιώντας έναν γνωστό ιό για την ταυτοποίηση της παρουσίας ειδικών αντισωμάτων εναντίον του σε ένα κλινικό δείγμα ορού (Dimmock *et al.*, 2016).

#### 1.8.2.3 Δοκιμή άμεσου ανοσοφθορισμού (Immunofluorescent Assay, IF)

Τα αντισώματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ιικών αντιγόνων μέσα στα μολυσμένα κύτταρα. Όταν τα κύτταρα είναι ζωντανά, τα αντισώματα δεν μπορούν να διασχίσουν τη μεμβράνη του πλάσματος και κατά συνέπεια αντιδρούν μόνο με αντιγόνα που εκτίθενται στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτός ο φραγμός διαπερατότητας καταστρέφεται με μονιμοποίηση των κυττάρων με οργανικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη ή η μεθανόλη. Η μονιμοποίηση διαπερατοποιεί την μεμβράνη του πλάσματος και επιτρέπει στα αντισώματα να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα και να συνδεθούν έτσι με τα αντιγόνα. Τα αντισώματα σημαίνονται πριν από τη χρήση με μια κάποιοι δείκτη και επομένως μπορούν να ανιχνευθούν *in situ*. Οι δείκτες είναι φθορίζουσες χρωστικές που μπορούν να ανιχνευθούν στο μικροσκόπιο με χρήση μιας πηγής υπεριώδους φωτός (UV) (Dimmock *et al.*, 2016).

#### 1.8.2.4 Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Αντισώματα που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με ένα ένζυμο δείκτη χρησιμοποιούνται σε μια ποσοτική δοκιμασία που ονομάζεται ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Προκειμένου να γίνει η



ανίχνευση, ένας γνωστός ιός ή τμήματα αυτού προσκολλάται πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια και έπειτα ακολουθεί η χρήση δύο ειδών αντισωμάτων. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό για τον ιό, το αντιγόνο στην προκειμένη περίπτωση, και δεν είναι σημασμένο με κάποιο δείκτη. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ειδικό για συντηρημένους επιτόπους πάνω στο πρωτογενές αντίσωμα και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Αυτό καθιστά την ELISA πιο ευαίσθητη καθώς αρκετά μόρια δευτερογενούς αντισώματος μπορούν να προσδεθούν σε ένα μόνο μόριο πρωτογενούς αντισώματος και το σήμα να ενισχυθεί κατά πολύ. Το έγχρωμο προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση του ενζύμου μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος, είναι ανάλογο με την ποσότητα του πρωτογενούς αντισώματος και μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Οι μέθοδοι ELISA έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν εύκολα να αυτοματοποιηθούν για να την ταυτόχρονη διάγνωση μεγάλου αριθμού δειγμάτων ρουτίνας (Dimmock *et al.*, 2016).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όλες οι τεχνικές έχουν τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς τους. Για παράδειγμα, οι ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης ιών είναι αποτελεσματικές και γρήγορες, αλλά δεν δίνουν πληροφορίες για το γονιδίωμα των παθογόνων παραγόντων. Οι δοκιμές εξουδετέρωσης είναι απλές, αλλά περιορίζονται σε ιούς που μπορούν να καλλιεργηθούν και αργούν να δώσουν αποτέλεσμα. Μια τέτοια κατάσταση δεν είναι καθόλου ιδανική, ένα πρόβλημα που επιλύεται με τη χρήση άμεσων μοριακών μεθόδων διάγνωσης (Dimmock *et al.*, 2016).

### 1.8.3 Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης

#### 1.8.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis. Η ανίχνευση και η μελέτη του νουκλεϊκού οξέος ενός παθογόνου παράγοντα όπως οι ιοί, απαιτεί μεγάλες ποσότητες από αυτό, κάτι που συνήθως δεν υπάρχει στα διαθέσιμα κλινικά δείγματα (Dimmock *et al.*, 2016). Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA ξεκινώντας από ελάχιστη ποσότητα γενωμικού υλικού, σε μια *in vitro* ενζυμική αντίδραση. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ταχύτητα, η αυξημένη ευαισθησία και η μεγάλη ειδικότητα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η δυνατότητα ταυτοποίησης και εξακρίβωσης των παθογόνων ιικών στελεχών (Πλαγεράς *κ.α.*, 2012) καθώς και το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τις πρώτες κιόλας ημέρες εμφάνισης της λοίμωξης.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τυπικά 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε θερμικός κύκλος αποτελείται από τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι αυτό της «αποδιάταξης» του εκμαγείου DNA (denaturation) και οι συνήθεις συνθήκες είναι 94-96°C για 20-60 δευτερόλεπτα. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο αλυσίδες και να γίνει δυνατή η υβριδοποίηση των εκκινητών. Το δεύτερο στάδιο του θερμικού κύκλου είναι η «σύνδεση των εκκινητών» με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες (primer annealing) και πραγματοποιείται σε συνθήκες 50-65°C για 20-60 δευτερόλεπτα. Ο λόγος που η θερμοκρασία μειώνεται είναι για να μπορέσουν οι εκκινητές να σχηματίσουν δεσμούς με το εκμαγείο. Το τρίτο, και τελευταίο, στάδιο είναι αυτό της «επιμήκυνσης» των συνδεδεμένων εκκινητών και της σύνθεσης DNA με κατεύθυνση 5'-3' (extension), κάτι που γίνεται σε συνθήκες 72°C για 0,5-2 λεπτά. Οι εκκινητές επεκτείνονται σύμφωνα με το συμπληρωματικό DNA-στόχο με dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια) και τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης σε μέση θερμοκρασία (Πλαγεράς κ.α., 2012). Είναι βολικό να χρησιμοποιείται μια πολυμεράση που δεν αδρανοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως η πολυμεράση Taq από το *Thermophilus aquaticus*, ένα βακτήριο που ζει σε φυσικές θερμές πηγές, διότι διαφορετικά θα πρέπει να προστείνεται φρέσκια πολυμεράση μετά από κάθε στάδιο «αποδιάταξης» (Dimmock *et al.*, 2016). Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο (Πλαγεράς κ.α., 2012).

Για να προσδιοριστεί εάν το προϊόν της PCR είναι θετικό για τον υπό έλεγχο παθογόνο παράγοντα, αυτό ηλεκτροφορείται προκειμένου να επιβεβαιωθεί το μέγεθος του τμήματος που πολλαπλασιάστηκε και να συγκριθεί με τα αναμενόμενα μεγέθη. Η επιβεβαίωση του αποτελέσματος μπορεί να επιτευχθεί και με απομόνωση του προϊόντος της PCR από το πήκτωμα και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας αυτού (Dimmock *et al.*, 2016).

#### 1.8.3.2 PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

Εάν ο ιός που μας ενδιαφέρει έχει γονιδίωμα RNA, η περιοχή ενδιαφέροντος πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε DNA μέσω μιας ενζυμικής διαδικασίας που λέγεται αντίστροφη μεταγραφή (Dimmock *et al.*, 2016). Αυτό γιατί το RNA δεν μπορεί να κλωνοποιηθεί ή να προσδιοριστεί σε επίπεδο αλληλουχίας όπως στην περίπτωση του DNA. Έτσι από το απομονωμένο μόριο RNA συντίθεται ένα συμπληρωματικό μόριο DNA (complementary DNA, cDNA) με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (π.χ. MMLV, AMV, Superscript κ.α.), επιτελώντας έτσι αντίστροφη μεταγραφή ενός στόχου RNA ώστε να παραχθούν αρχικά υβρίδια RNA-cDNA. Για να αντικατασταθεί

όμως ο κλώνος RNA με DNA και να δημιουργηθεί ένα πλήρες δίκλωνο μόριο DNA, θα πρέπει να υδρολυθεί ο κλώνος RNA και να συντεθεί ένας νέος κλώνος DNA με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει η ενίσχυση της ιϊκής περιοχής ενδιαφέροντος με μια συμβατική αντίδραση PCR (Πλαγεράς κ.α., 2012).

#### 1.8.3.3 PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR και πρωτοεμφανίστηκε το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του. Συνήθως, το μέγεθος του νουκλεοτιδικού τμήματος που επιλέγεται για ενίσχυση κυμαίνεται μεταξύ 50-150 βάσεων, ενώ σπανιότερα μπορεί να φτάνει μέχρι και τις 300 βάσεις. Με αυτή τη μέθοδο μετράται η συγκέντρωση των προϊόντων της PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης με τη βοήθεια αντιδράσεων φθορισμού, προτού περιοριστούν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, συσσωρευτούν αναστολές ή απενεργοποιηθεί η πολυμεράση και, κατά συνέπεια, μειωθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης. Η τεχνική αυτή είναι ταχύτερη από τις υπόλοιπες μεθόδους PCR αφού παρέχει πληροφορίες κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται αμέσως μετά το πέρας της αντίδρασης χωρίς επιπλέον τεχνικές (Πλαγεράς κ.α., 2012; Stratagene, 2010).

Σε αυτή την τεχνική εμπίπτει η τεχνολογία Taqman που βασίζεται στην 5'-3' εξωνουκλεοτιδική ενεργότητα της Taq πολυμεράσης χρησιμοποιώντας παράλληλα διπλά σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια ιχνηθέτες (probes), τα οποία εκπέμπουν σήμα φθορισμού μόνο όταν κοπούν. Πιο συγκεκριμένα, η Taq πολυμεράση κόβει ένα εσωτερικό μη επεκτεινόμενο probe που ονομάζεται Taqman, κατά τη φάση της επιμήκυνσης της PCR. Ο Taqman probe είναι διπλά σημασμένος έχοντας στο ένα άκρο του ένα μόριο ανταποκριτή (reporter fluorescent dye) που φέρει μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς, όπως για παράδειγμα η FAM, και στο άλλο άκρο του ένα μόριο αποσβέστη (quencher), όπως για παράδειγμα το BBQ. Η εκπομπή του φθορισμού γίνεται όταν απομακρύνεται η φθορίζουσα χρωστική από τον αποσβέστη. Μάλιστα, η ένταση του φθορισμού αυξάνει καθώς συσσωρεύονται όλο και περισσότερα μόρια της ακολουθίας στόχου. Η τεχνική Taqman είναι πολύ ευαίσθητη και οφείλεται στην συμπληρωματικότητα των εκκινητών και του ιχνηθέτη με την ακολουθία στόχο, γιατί ο φθορισμός εκπέμπεται μόνο εάν ο ιχνηθέτης προσδεθεί στην ακολουθία στόχο που ενισχύεται (Πλαγεράς κ.α., 2012).

Για την ποσοτική ανάλυση είναι απαραίτητο να καθοριστεί ο οριακός κύκλος ανίχνευσης (Threshold cycle, Ct), δηλαδή το σημείο ανίχνευσης του σήματος

φθορισμού πάνω από τον «θόρυβο» (background noise) της αντίδρασης. Αυτός είναι ο αριθμός των κύκλων που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και ορίζεται ως το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του στοιχειώδους ανιχνεύσιμου σήματος (Πλαγεράς κ.α., 2012). Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης και επιλέγεται η κατάλληλη ανάλογα με το σκοπό του πειράματος. Εάν είναι επιθυμητός ο ακριβής υπολογισμός της ποσότητας της αλληλουχίας στόχου στο δείγμα, χρησιμοποιείται η πρότυπη καμπύλη (standard curve) για απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification), ενώ εάν δεν είναι απαραίτητος ο ακριβής προσδιορισμός, χρησιμοποιείται η σχετική ποσοτικοποίηση (relative or comparative quantification). Στην σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται μέτρηση της συγκέντρωσης του γονιδίου ενδιαφέροντος σε άγνωστα δείγματα σε σύγκριση με ένα βαθμονομητή ή με ένα δείγμα ελέγχου.

Εκτός από την Taqman, ευρέως διαδεδομένη είναι και η τεχνολογία SYBR Green. Αυτή δεν χρησιμοποιεί τη χρήση εξειδικευμένου ιχνηθέτη ελαττώνοντας έτσι το κόστος της αντίδρασης, ενώ προσδένεται μη-ειδικά στα δίκλωνα μόρια DNA που υπάρχουν ή που δημιουργούνται κατόπιν ενίσχυσης. Πιο πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί και άλλες τεχνολογίες που χρησιμοποιούν μοριακούς φάρους (molecular beacons), σκορπιούς (scorpions) και ιχνηθέτες υβριδισμού (hybridization probes) (Πλαγεράς κ.α., 2012).

#### 1.8.3.4 Αλληλούχηση

Η καλύτερη μέθοδος για τον ακριβή καθορισμό μιας ακολουθίας νουκλεϊκών οξέων είναι η αλληλούχηση της. Η ταυτοποίηση μιας αλληλουχίας χρησιμεύει ιδιαίτερα στη διάγνωση ιικών λοιμώξεων, στην ταυτοποίηση των υπεύθυνων παθογόνων, στην ανίχνευση τυχόν μεταλλάξεων του ιικού γονιδιώματος, καθώς και στον εντοπισμό νέων στελεχών.

##### 1.8.3.4.1 Αλληλούχηση κατά Sanger

Όπως και μια αντίδραση PCR, η αλληλούχηση του DNA περιλαμβάνει μια τροποποίηση της φυσιολογικής κυτταρικής διαδικασίας της αντιγραφής του DNA. Όπως με τις περισσότερες συνθετικές DNA αντιδράσεις, οι αντιδράσεις αλληλούχησης απαιτούν τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου ως εκκινητή, το τμήμα DNA-στόχο που θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου, DNA πολυμεράση και dNTPs που θα χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την εκ νέου σύνθεση της ακολουθίας. Ωστόσο, η αντίδραση αλληλούχησης του DNA απαιτεί επίσης έναν τρόπο

αναγνώρισης κάθε βάσης που θα προστίθεται στον αυξανόμενο κλώνο του DNA. Οι συννηθέστερες χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για DNA αλληλούχηση συνεπάγονται τη χρήση τροποποιημένων νουκλεοτιδίων που μπορεί να ενσωματωθούν στο νέο τμήμα του DNA, αλλά δεν επιτρέπουν την συνέχιση της σύνθεσής του. Αυτά λέγονται διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), στερούνται του 3'-υδροξυλίου και επομένως εμποδίζεται η προσθήκη της επόμενης βάσης και τερματίζεται η σύνθεση του DNA. Κάθε διδεοξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) περιλαμβάνει επίσης έναν φθορίζοντα ιχνηθέτη, διαφορετικό για το κάθε ddNTP. Όταν ένα ddNTP ενσωματώνεται επιτυχώς στην αλληλουχία, φθορίζει και ένα λείζερ μέσα στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα που χρησιμοποιείται για να διαβάσει την αλληλουχία, ανιχνεύει μια ένταση φθορισμού που μεταφράζεται σε μια "κορυφή." Έτσι λοιπόν, με την προσθήκη κάθε βάσης, ανιχνεύεται ο αντίστοιχος φθορισμός και γίνεται ανάγνωση της αλληλουχίας από τον υπολογιστή (Πλαγεράς κ.α., 2012).

#### 1.8.3.4.2 Αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Η αλληλούχηση νέας γενιάς έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια. Η κύρια διαφορά μεταξύ της NGS και των πιο παραδοσιακών μεθόδων αλληλούχησης όπως η Sanger, είναι ότι η NGS μπορεί να αλληλουχήσει πολλά περισσότερα νουκλεοτίδια ανά δοκιμασία, είναι δηλαδή μια μέθοδος υψηλής απόδοσης. Σε σχέση με τα 800-1000 νουκλεοτίδια που μπορούν να αλληλουχηθούν κατά τη διάρκεια μιας τυπικής δοκιμασίας Sanger, με τις πλατφόρμες NGS μπορούν να αλληλουχηθούν εκατομμύρια νουκλεοτίδια. Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι η NGS μπορεί να λειτουργήσει με μαζικό παράλληλο τρόπο. Συγκεκριμένα, μπορούν να αλληλουχηθούν πολλά διαφορετικά δείγματα ταυτοχρόνως. Η τελευταία ουσιαστική διαφορά είναι ότι η NGS μπορεί να πραγματοποιήσει αλληλούχηση νουκλεϊκών οξέων με πάρα πολύ μεγάλη ευαισθησία. Αυτά τα πλεονεκτήματα, σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους, κάνουν δυνατή την αλληλούχηση περισσότερων γονιδιωματικών στόχων, καθώς και ολόκληρων γονιδιωμάτων, με ταχύτερο ρυθμό και χαμηλότερο κόστος (Wanger *et al.*, 2017).

Πολλές διαφορετικές πλατφόρμες και τεχνολογίες είναι διαθέσιμες για την αλληλούχηση νέας γενιάς, ωστόσο, η βασική ιδέα για όλες είναι η ίδια. Στην NGS, υπάρχουν κάποια σημαντικά βήματα. Το πρώτο βήμα είναι η προετοιμασία της βιβλιοθήκης, όπου οι αλληλουχίες στόχοι κατακερματίζονται και τα θραύσματα τροποποιούνται με μοριακούς προσαρμογείς και γραμμωτούς κώδικες προκειμένου να αναγνωρίζεται η εκάστοτε αλληλουχία στόχος. Οι γραμμωτοί κώδικες λειτουργούν ως σημεία αναφοράς κατά τα επόμενα βήματα. Ακολουθώς, κατά την διάρκεια της

κλωνικής ενίσχυσης, οι μεμονωμένες νουκλεοτιδικές ακολουθίες διαμερισματοποιούνται επιτρέποντας σε κάθε μεμονωμένη ακολουθία να ενισχυθεί πολλές φορές το συγκεκριμένο τμήμα της πλατφόρμας. Στο επόμενο βήμα, αυτές οι μεμονωμένες νουκλεοτιδικές ακολουθίες προσδιορίζονται σε επίπεδο αλληλουχίας. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες αυτές χαρτογραφούνται και ευθυγραμμίζονται με νουκλεοτιδικές ακολουθίες αναφοράς, με την βοήθεια κατάλληλου υπολογιστικού λογισμικού, και γίνεται η εξαγωγή συμπερασμάτων (Wanger *et al.*, 2017).

## **2. Σκοπός**

Οι ιοί Usutu και Toscana παραμένουν δύο παραμελημένα ανθρώπινα παθογόνα, με λίγους γιατρούς να έχουν επίγνωση της δυνατότητας των ιών αυτών να προκαλούν λοιμώξεις του ΚΝΣ. Είναι, λοιπόν, αναγκαία η πληρέστερη γνώση του παθογόνου ρόλου τους, καθώς και του εύρους εξάπλωσής τους.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση και η προτυποποίηση γρήγορων, αξιόπιστων, με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, μεθόδων real-time RT-PCR, με στόχο την εφαρμογή τους σε διαγνωστικό επίπεδο για την ανίχνευση των ιών Usutu και Toscana σε κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) ανθρώπων. Στο πλαίσιο της αναδρομικής μελέτης της παρουσίας των δύο αυτών αρμποιών, δημιουργήθηκε μια βάση με όλα τα κλινικά δείγματα ENY που παρέλαβε το Διαγνωστικό τμήμα του Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας τα τελευταία 2,5 έτη με στόχο τη συλλογή μεγάλου εύρους στοιχείων και πληροφοριών για το κάθε δείγμα. Αυτό θα φανεί χρήσιμο, τόσο για την συνέχιση της συγκεκριμένης επιδημιολογικής μελέτης, όσο και για μελλοντικές μελέτες του εργαστηρίου πάνω σε κλινικά δείγματα ENY.

## **3. Υλικά και Μέθοδοι**

### **3.1 Απομόνωση RNA από κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)**

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε από κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) με το QIAamp® Viral RNA mini κιτ της Qiagen και τις αντίστοιχες οδηγίες. Το υψηλής ποιότητας RNA εκλούεται σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς RNases, έτοιμο για άμεση χρήση ή για αποθήκευση. Το καθαρισμένο RNA είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες, νουκλεάσες και άλλους αναστολείς. Το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα Ι: Πειραματικά πρωτόκολλα.

### 3.2 Θετικοί μάρτυρες Usutu και Toscana

Οι θετικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για τις real-time RT-PCR ήταν από εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο δικτύου στο οποίο συμμετείχε το Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ το 2017 (EVD-LaBNet 2<sup>nd</sup> EQA for neurotropic viruses – Nov. 2017). Για τον ιό Toscana, το κλινικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε είχε κωδικό «0253» και για τον Usutu, «814». Η απομόνωση RNA έγινε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα. Εκτός του δείγματος «0253», για τον Toscana υπήρχε άλλος ένας θετικός μάρτυρας με κωδικό «0113». Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών μαρτύρων ήταν ότι, ο ένας ήταν θετικός για στέλεχος της γενεαλογίας A (0253) και ο άλλος για στέλεχος της γενεαλογίας B (0113). Χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο σε πρώτη φάση για να ελεγχθεί η ειδικότητα της μεθόδου και για τις δύο γενεαλογίες και στη συνέχεια ο μάρτυρας «0253» χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου.

### 3.3 Δημιουργία βάσης δεδομένων ENY

Σε πρώτη φάση δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων με τη χρήση της εφαρμογής Microsoft Excel για την καταγραφή των κλινικών δειγμάτων ENY που συγκεντρώθηκαν για τη μελέτη από τον Ιανουάριο του 2017 έως και τον Ιούνιο του 2019. Τα δεδομένα που καταχωρήθηκαν, συλλέχθηκαν από το εσωτερικό πρόγραμμα καταχώρισης δειγμάτων του Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας (Medicine) και περιλάμβαναν τα εξής στοιχεία:

- τον εσωτερικό εξαψήφιο κωδικό αρίθμησης του κλινικού δείγματος
- το φύλο του ασθενούς
- την ηλικία του ασθενούς
- το είδος του κλινικού δείγματος (ENY)
- την ημερομηνία παραλαβής του κλινικού δείγματος και
- το ποιοτικό αποτέλεσμα (Αρνητικό-Θετικό) της διάγνωσης του δείγματος για όσα από τα παρακάτω παθογόνα πραγματοποιήθηκε εξέταση: Εντεροϊοί, ιός της Ιλαράς, ιός του Έρπητα 1,2,6,7 και 8, ιός της Ανεμευλογιάς, ιός Έπσταϊν-Μπαρ, ιός του Δυτικού Νείλου, Παρβοϊός B19, Αδενοϊοί, Κυτταρομεγαλοϊός και Τοξόπλασμα.

Αρχικά, δημιουργήθηκε μια βάση με όλα τα κλινικά δείγματα ENY που παρέλαβε το Διαγνωστικό τμήμα του Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας στο χρονικό διάστημα που προαναφέρθηκε. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μια ομαδοποίηση μόνο με όσα δείγματα από τα υπάρχοντα ήταν αρνητικά για τα παθογόνα που εξετάστηκαν. Τα κλινικά δείγματα ENY αυτής της ομάδας, ήταν και αυτά που επιλέχθηκαν για την αναδρομική μελέτη της παρουσίας των ιών Usutu και Toscana. Τα κλινικά δείγματα ENY καθώς και τα αντίστοιχα RNA των ENY φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80°C.

### 3.4 Αναζήτηση και επιλογή μεθόδων real-time RT-PCR για την ανίχνευση των ιών Usutu και Toscana

Πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση με σκοπό την αναζήτηση των καταλληλότερων μεθόδων real-time RT-PCR για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης αναδρομικής μελέτης της παρουσίας των ιών Usutu και Toscana. Όλες οι μέθοδοι που συγκρίθηκαν και αξιολογήθηκαν, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των δύο ιών σε περιπτώσεις ανθρώπινων λοιμώξεων, σε αναδρομικές μελέτες πάνω σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα, καθώς και σε επιδημιολογικές μελέτες σε χώρες της Ευρώπης, αλλά και της ευρύτερης λεκάνης της Μεσογείου, που γειτονεύουν με την Ελλάδα. Για την ανίχνευση του ιού Usutu, επιλέχθηκαν αρχικά δύο μέθοδοι real-time RT-PCR που αναπτύχθηκαν από τους Jöst, και συν., (Jöst *et al.*, 2011) και Nikolay, και συν., (Nikolay *et al.*, 2014) αντίστοιχα. Για την ανίχνευση του ιού Toscana, οι μέθοδοι real-time RT-PCR που επιλέχθηκαν ήταν τρεις και αναπτύχθηκαν από τους Pérez-Ruiz, και συν., (Pérez-Ruiz *et al.*, 2007), Weidmann, και συν., (Weidmann *et al.*, 2008) και Brisbarre, και συν., (Brisbarre *et al.*, 2015) αντίστοιχα.

### 3.5 Ιικά γονίδια στόχοι των επιλεγμένων μεθόδων real-time RT-PCR

#### 3.5.1 Γονίδια στόχοι των μεθόδων για τον ιό Usutu

Η μέθοδος «Jöst» στοχεύει ένα τμήμα 91 νουκλεοτιδίων του γονιδίου NS1 του ιού Usutu (Jöst *et al.*, 2011) και η μέθοδος «Nikolay» στοχεύει ένα τμήμα 103 νουκλεοτιδίων του γονιδίου NS5 του ιού (Nikolay *et al.*, 2014). Και τα δύο γονίδια κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες.



### 3.5.2 Γονίδια στόχοι των μεθόδων για τον ιό Toscana

Η μέθοδος «Pérez-Ruiz» στοχεύει ένα τμήμα 89 νουκλεοτιδίων του γονιδίου N του ιού Toscana (Pérez-Ruiz *et al.*, 2007) και η «Weidmann» ένα τμήμα 130 νουκλεοτιδίων του ίδιου γονιδίου (Weidmann *et al.*, 2008). Η μέθοδος «Brisbarre» στοχεύει ένα τμήμα 105 νουκλεοτιδίων του γονιδίου NS του ιού (Brisbarre *et al.*, 2015). Όπως είδη έχει αναφερθεί, το γονίδιο N κωδικοποιεί την ιϊκή νουκλεοπρωτεΐνη N και το NS μια μη δομική πρωτεΐνη. Και τα δύο γονίδια βρίσκονται στο γονιδιακό τμήμα S, το ένα από τα τρία τμήματα στα οποία οργανώνεται το ιϊκό γονιδίωμα του Toscana, μήκους 1869 νουκλεοτιδίων.

### 3.6 Στοιχίση αλληλουχιών ιϊκών στελεχών με εκκινητές και ιχνηθέτες στην εφαρμογή BioEdit

Η εφαρμογή BioEdit, είναι ένα λογισμικό στοιχίσης και επεξεργασίας αλληλουχιών με πολλές δυνατότητες. Μια από αυτές είναι η πολλαπλή στοιχίση αλληλουχιών με χρήση του προγράμματος CLUSTALW, που είναι ίσως και το πιο γνωστό και πιο χρησιμοποιημένο πρόγραμμα για αυτό το σκοπό. Το πρόγραμμα CLUSTALW ακολουθεί τη μέθοδο προοδευτικής πολλαπλής στοιχίσης (progressive multiple alignment method), κατά την οποία η στοιχίση των αλληλουχιών γίνεται προοδευτικά ξεκινώντας από δυο αλληλουχίες και σταδιακά προστίθενται στην στοιχίση μια-μια, οι υπόλοιπες. Μάλιστα, το συγκεκριμένο πρόγραμμα ήταν το πρώτο που αξιοποίησε και τη μέθοδο «στοίχησης προφίλ» (profile alignment) με την προοδευτική πολλαπλή στοιχίση. Το λεγόμενο profile alignment, μετράει τη σχετική συνεισφορά όλων των αλληλουχιών της κάθε στοιχίσης και τελικά πραγματοποιεί την πολλαπλή στοιχίση λαμβάνοντας υπόψη όλες τις αλληλουχίες.

Στην παρούσα περίπτωση, συνολικά έγιναν πέντε ομαδοποιημένες στοιχίσεις. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε στοιχίση 15 ιϊκών στελεχών Usutu με τους εκκινητές και ιχνηθέτες των μεθόδων «Jöst» και «Nikolay» και, ομοίως για τον ιό Toscana, πραγματοποιήθηκε στοιχίση 23 ιϊκών στελεχών με τους εκκινητές και ιχνηθέτες των μεθόδων «Pérez-Ruiz», «Weidmann» και «Nikolay» αντίστοιχα. Με βάση τα αποτελέσματα των στοιχίσεων καθώς και δεδομένα από την βιβλιογραφία, έγινε η τελική επιλογή των μεθόδων για την διεξαγωγή των πειραμάτων (βλ. ενότητα 4.3 των αποτελεσμάτων)

### 3.7 Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών των μεθόδων real-time RT-PCR

#### 3.7.1 Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη της μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Usutu

Για την διεκπεραίωση της αναδρομικής μελέτης της παρουσίας του ιού Usutu σε κλινικά δείγματα ENY ανθρώπων, πραγματοποιήθηκε real-time RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο του άρθρου της ερευνητικής ομάδας των Nikolay, και συν. (Nikolay *et al.*, 2014). Συγκεκριμένα, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου NS5, μήκους 103 νουκλεοτιδίων, με χρήση των εξής εκκινητών:

USUV sense primer → 5' CAAAGCTGGACAGACATCCCTTAC 3'

USUV antisense primer → 5' CGTAGATGTTTTTCAGCCACGT 3'

και του εξής ιχνηθέτη:

USUV probe® Taqman → 5' (FAM) AAGACATATGGTGTGGAAGCCTGATAGGCA-BBQ 3'

(σημασμένος στο 5' άκρο με φλουορεσκίνη που εκπέμπει στα 520 nm και συνδεδεμένος στο 3' άκρο με μόριο αποσβέστη BBQ που απορροφά στα 480-580 nm)

#### 3.7.2 Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη της 1<sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana

Για την διεκπεραίωση της αναδρομικής μελέτης της παρουσίας του ιού Toscana σε κλινικά δείγματα ENY ανθρώπων, πραγματοποιήθηκε real-time RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο του άρθρου της ερευνητικής ομάδας των Pérez-Ruiz, και συν. (Pérez-Ruiz *et al.*, 2007). Συγκεκριμένα, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου N, μήκους 89 νουκλεοτιδίων, με χρήση των εξής εκκινητών:

TOSV-P sense primer → 5' TGCTTTTCTTGATGAGTCTGCAG 3'

TOSV-P antisense primer → 5' CAATGCGCTTYGGRTCAA 3'

και του εξής ιχνηθέτη:

TOSV-P probe® Taqman →

5' (FAM) ATCAATGCATGGGTRAATGAGTTTGCTTACC -BBQ 3'

(σημασμένος στο 5' άκρο με φλουορεσκίνη που εκπέμπει στα 520 nm και συνδεδεμένος στο 3' άκρο με μόριο αποσβέστη BBQ που απορροφά στα 480-580 nm)

### 3.7.3 Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθέτη της 2<sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana

Για την διεκπεραίωση της αναδρομικής μελέτης της παρουσίας του ιού Toscana σε κλινικά δείγματα ENY ανθρώπων, πραγματοποιήθηκε real-time RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο του άρθρου της ερευνητικής ομάδας των Weidmann, και συν. (Weidmann et al., 2008). Συγκεκριμένα, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου N, μήκους 130 νουκλεοτιδίων, με χρήση των εξής εκκινητών:

TOSV-W sense primer → 5' GGGTGCATCATGGCTCTT 3'

TOSV-W antisense primer → 5' GCAGRGACACCATCACTCTGTC 3'

και του εξής ιχνηθέτη:

TOSV-W probe® Taqman →

5' (FAM) CAATGGCATCCATAGTGGTCCCAGA -BBQ 3'

(σημασμένος στο 5' άκρο με φλουορεσκίνη που εκπέμπει στα 520 nm και συνδεδεμένος στο 3' άκρο με μόριο αποσβέστη BBQ που απορροφά στα 480-580 nm)

### 3.8 Βελτιστοποίηση των μεθόδων real-time RT-PCR

Τα βασικά χαρακτηριστικά μιας αντίδρασης real-time RT-PCR είναι η ειδικότητα και η ευαισθησία. Για να επιτευχθούν αυτά στον βέλτιστο δυνατό βαθμό μπορούν να τροποποιηθούν πολλοί παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των ιόντων Mg<sup>2+</sup>, η συγκέντρωση των εκκινητών, η συγκέντρωση των ιχνηθετών, καθώς και τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται. Να σημειωθεί εκ των προτέρων ότι όλες οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια βελτιστοποίησης, έγιναν εις διπλούν.

#### 3.8.1 Επιλογή κατάλληλων ενζύμων για την κάθε μέθοδο

Στο πρώτο στάδιο βελτιστοποίησης έγινε δοκιμή δύο διαφορετικών κιτ real-time RT-PCR, που βάσει της εμπειρίας του εργαστηρίου είναι αξιόπιστα για χρήση σε διαγνωστικές μεθόδους ανίχνευσης ιϊκού RNA, και εξακριβώθηκε ποιο ήταν το κατάλληλο για κάθε μια από τις μεθόδους. Τα συμπεράσματα βγήκαν μετά από

παράλληλη σύγκριση του θορύβου, των επιπέδων φθορισμού και των Ct που προέκυψαν. Το πρώτο κιτ ήταν το SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, που παράγεται από την εταιρία Invitrogen (Cat. No. 11732-020), και το δεύτερο ήταν το qPCRBIO Probe 1-Step Go NO-Rox, της εταιρίας PCRBiosystems (Cat. No. PB25.43-03). Τα αρχικά μίγματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το φύλλο οδηγιών του εκάστοτε κιτ και με τα πρωτόκολλα των άρθρων των ερευνητικών ομάδων των Nikolay, Pérez-Ruiz και Weidmann αντίστοιχα (Pérez-Ruiz *et al.*, 2007; Weidmann *et al.*, 2008; Nikolay *et al.*, 2014). Για το κιτ της PCR Biosystems έγινε μια επιπλέον δοκιμή δύο διαφορετικών τελικών όγκων αντίδρασης, 20 μl και 25 μl. Εκτός από τον τελικό όγκο, διαφοροποιήθηκε μόνο ο όγκος θετικού μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε, ο οποίος ήταν 5 μl και 7 μl αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αντιδρώντων ήταν ίδιες, με εξαίρεση την αναγκαστική προσαρμογή στον όγκο του ddH<sub>2</sub>O. Ο τελικός όγκος αντίδρασης για το κιτ της Invitrogen ήταν εξαρχής 25 μl.

### 3.8.2 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιόντων Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub>)

Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές και είναι απαραίτητος συμπαραγόντας της DNA πολυμεράσης. Υψηλή συγκέντρωση Mg<sup>2+</sup> οδηγεί σε μη ειδικό υβριδισμό των εκκινητών στο DNA, οδηγώντας έτσι σε παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Αντίστοιχα, χαμηλές συγκεντρώσεις Mg<sup>2+</sup> οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Για αυτό το λόγο, η βέλτιστη συγκέντρωση Mg<sup>2+</sup> για κάθε αντίδραση real-time RT-PCR πρέπει να προσδιορίζεται.

Εφόσον το κιτ qPCRBIO Probe 1-Step Go NO-Rox που επιλέχθηκε για τις δύο μεθόδους ανίχνευσης του ιού Toscana δεν απαιτεί προσθήκη MgSO<sub>4</sub> (βλ. ενότητα 4.4.1 των αποτελεσμάτων), οι δοκιμές βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης MgSO<sub>4</sub> πραγματοποιήθηκαν μόνο για τη μέθοδο ανίχνευσης του ιού Usutu. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 3 mM, 4 mM και 5 mM. Να σημειωθεί ότι, το ρυθμιστικό διάλυμα 1X Reaction Mix του κιτ SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System περιέχει ήδη 3 mM MgSO<sub>4</sub>. Για τον λόγο αυτό, για τον έλεγχο της συγκέντρωσης 3 mM δεν έγινε επιπλέον προσθήκη MgSO<sub>4</sub> στο μίγμα της PCR, ενώ για τον έλεγχο των συγκεντρώσεων 4 mM και 5 mM πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 1 mM και 2 mM MgSO<sub>4</sub> αντίστοιχα.

### 3.8.3 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση μιας real-time RT-PCR είναι η συγκέντρωση των εκκινητών, καθώς μια πολύ χαμηλή συγκέντρωση συνεπάγεται αστάθεια των ολιγονουκλεοτιδίων, ενώ μια ιδιαίτερα υψηλή τη δημιουργία παραπροϊόντων και μη ειδικών δομών. Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης των εκκινητών, για τη μέθοδο ανίχνευσης του ιού Usutu δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 0.2  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  και 0.8  $\mu\text{M}$ , για την 1<sup>η</sup> μέθοδο ανίχνευσης του ιού Toscana δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 0.2  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.8  $\mu\text{M}$  και 1  $\mu\text{M}$  και τέλος, για την 2<sup>η</sup> μέθοδο ανίχνευσης του ιού Toscana δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 0.2  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  και 0.8  $\mu\text{M}$ . Όλες οι δοκιμές έγιναν διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες σταθερές.

### 3.8.4 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιχνηθετών

Για την επίτευξη του υψηλότερου δυνατού φθορισμού σε συνδυασμό με τον χαμηλότερο δυνατό θόρυβο και το καλύτερο δυνατό Ct, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης ιχνηθετών σε κάθε μια από τις τρεις μεθόδους real-time RT-PCR. Στα πλαίσια των πειραμάτων, τόσο στη μέθοδο ανίχνευσης του ιού Usutu, όσο και στις δύο μεθόδους ανίχνευσης του ιού Toscana, δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 0.1  $\mu\text{M}$  και 0.2  $\mu\text{M}$ . Όλες οι δοκιμές έγιναν διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες σταθερές.

Τα τελικά πρωτόκολλα των μεθόδων real-time RT-PCR περιγράφονται στο Παράρτημα Ι: Πειραματικά πρωτόκολλα.

## 3.9 Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος - Μάρτυρες για την αξιοπιστία του αποτελέσματος

Ο θετικός μάρτυρας PCR χρησιμοποιείται κάθε φορά που διενεργείται η εκάστοτε εξέταση, τόσο για τον έλεγχο της διαδικασίας της (αντιδραστήρια, συσκευή Real-time PCR), όσο και για τον εντοπισμό ενδεχόμενης μεταβολής στην ευαισθησία της κάθε μεθόδου. Για την ανίχνευση του USUV χρησιμοποιήθηκε αραιώση θετικού δείγματος Usutu που επιλέχθηκε από τα δείγματα του εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου «EVD-LaBNet 2<sup>nd</sup> EQA for neurotropic viruses – Nov. 2017». Για την ανίχνευση του TOSV χρησιμοποιήθηκε αραιώση θετικού δείγματος Toscana (γενεαλογίας B) που επιλέχθηκε από τα δείγματα του ίδιου εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου.

Ο αρνητικός μάρτυρας PCR χρησιμοποιείται κάθε φορά που διενεργείται η

εκάστοτε εξέταση με στόχο τον έλεγχο επιμόλυνσης στο μίγμα εργασίας. Συγκεκριμένα, πρόκειται για αποστειρωμένο νερό κατάλληλο για μοριακές τεχνικές της εταιρείας Invitrogen (Cat. No. R0601).

Για τον έλεγχο επιμολύνσεων στους χώρους που πραγματοποιούνται οι μοριακές μέθοδοι χρησιμοποιείται το “Swab Test”. Για να γίνει αυτό, τοποθετούνται σταγόνες 1ml αποστειρωμένου νερού στους πάγκους που διεκπεραιώνονται οι διαδικασίες της PCR και μένουν εκεί για 10 λεπτά. Κατόπιν, οι σταγόνες φυλάσσονται σε σωληνάκι Eppendorf χωρητικότητας 2ml, στους -70°C, και υπόκεινται σε έλεγχο για πιθανή επιμόλυνση του περιβάλλοντος από τους ιούς Usutu ή Toscana.

Σημαντικός είναι επίσης ο μάρτυρας αναστολής/επάρκειας γενωμικού υλικού. Μία βασική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά τη διάρκεια μιας PCR είναι η ποιότητα του δείγματος (DNA ή RNA), η οποία εξαρτάται κυρίως από την ύπαρξη αναστολέων και την επάρκεια του γενωμικού υλικού. Οι αναστολείς σε ένα δείγμα μπορεί να προέρχονται είτε από τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση, είτε από διάφορα συστατικά του βιολογικού δείγματος, όπως είναι η ουρία, η αιμοσφαιρίνη ή η ηπαρίνη και είναι πιθανό να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Στο συγκεκριμένο εργαστήριο, τα δείγματα ελέγχονται για αναστολείς και επάρκεια γενωμικού υλικού μέσω της ανίχνευσης με real-time PCR τεχνολογίας TaqMan του ενδογενούς ανθρώπινου γονιδίου RNase P.

### 3.10 Κυτταροκαλλιέργειες για ιϊκή ανάπτυξη

Στο πλαίσιο της διεξαγωγής των διαγνωστικών εξετάσεων, το Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ διατηρεί αρκετές κυτταρικές σειρές σε μόνιμη βάση. Υπήρξε, λοιπόν, η δυνατότητα καλλιέργειας ιϊκών στελεχών Usutu και Toscana με στόχο, τόσο την απόκτηση θετικών μαρτύρων αναφοράς υψηλού ιϊκού φορτίου, όσο και τη μετέπειτα χρήση αυτών σε πειράματα τεκμηρίωσης των τριών μεθόδων real-time RT-PCR που αναπτύχθηκαν στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

Προκειμένου να καλλιεργηθεί το στέλεχος Usutu SAAR-1776 χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά C6/36 που προέρχεται από το είδος κουνουπιού *Aedes albopictus*. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο υψηλής γλυκόζης DMEM, στο οποίο προστέθηκαν τα αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και Hepes, και το οποίο εν συνεχεία εμπλουτίστηκε με 10% FBS και 1% TPB. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 28°C παρουσία 5% CO<sub>2</sub>, έως ότου φτάσουν την επιθυμητή συγκέντρωση.

Προκειμένου να καλλιεργηθεί το στέλεχος Toscana 2016/FR/6371 (γενεαλογία Β) χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά Vero που προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα νεφρού αφρικανικού πράσινου πιθήκου. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο υψηλής γλυκόζης DMEM, στο οποίο προστέθηκαν τα αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και Herpes, και το οποίο εν συνεχεία εμπλουτίστηκε με 10% FBS. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 36°C παρουσία 5% CO<sub>2</sub>, έως ότου φτάσουν την επιθυμητή συγκέντρωση.

Η διαδικασία του εμβολιασμού των ιών στις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές είναι η ίδια και για τα δύο είδη ιών και περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα Ι: Πειραματικά πρωτόκολλα.

Αφού εντοπίστηκε κυτταροπαθητική δράση των ιών (CPE, Cytopathic Effect), έγινε συλλογή των καλλιεργητικών μέσων μέσα στα οποία βρίσκονταν τα ιικά σωματίδια και 200 μl από αυτά χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση ολικού RNA, προκειμένου να γίνει εκτίμηση του ιικού φορτίου μέσω Real Time RT-PCR και να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες υψηλής συγκέντρωσης στα ακόλουθα πειράματα τεκμηρίωσης.

### 3.11 Έλεγχος ειδικότητας των μεθόδων real-time RT-PCR

Σκοπός της τεκμηρίωσης των μεθόδων είναι η απόδειξη της καταλληλότητάς τους για την ανίχνευση του RNA των ιών Usutu και Toscana αντίστοιχα, καθώς και την επικείμενη διάγνυσή τους σε βιολογικά υλικά. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της εκάστοτε μεθόδου που ορίζει την τεκμηρίωση αυτής, είναι η ειδικότητα (specificity).

Όλες οι δοκιμασίες real-time RT-PCR, προκειμένου να χαρακτηριστούν ειδικές, πρέπει να ενισχύουν αποκλειστικά το γονιδιακό τμήμα για το οποίο σχεδιάστηκαν και κανένα άλλο. Με άλλα λόγια δεν πρέπει να υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα, ειδικά όταν οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται στα πλαίσια διάγνωσης παθογόνων παραγόντων, καθώς αυτό μπορεί να έχει επιπτώσεις στον ασθενή και στη θεραπεία που θα ακολουθήσει. Στα πλαίσια του ελέγχου της ειδικότητας των τριών μεθόδων αυτής της μελέτης, τόσο η μέθοδος ανίχνευσης του ιού Usutu, όσο και οι δύο μέθοδοι ανίχνευσης του ιού Toscana, δοκιμάστηκαν με θετικούς μάρτυρες επτά παθογόνων παραγόντων με παρόμοιο εύρος συμπτωμάτων ή/και τρόπο μετάδοσης. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν θετικοί μάρτυρες για το παράσιτο *Plasmodium Falciparum* (PF), που προκαλεί ελονοσία, για τον ιό Chikungunya (ChikV), τον ιό του Δάγκειου Πυρετού (DENV), τον ιό Zika (ZikV), τους Εντεροϊούς (EV), τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV), καθώς και για τον ιό της Ιλαράς (Measles). Να σημειωθεί ότι, πρόκειται για παθογόνα που εξετάζονται στο Διαγνωστικό τμήμα του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

## **Αποτελέσματα**

### **4.1 Απομόνωση RNA από κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)**

Κατά την διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση RNA από 183 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Από αυτά, όσα δείγματα ήταν αρνητικά για τα παθογόνα που εξετάστηκαν στα πλαίσια λειτουργίας του Διαγνωστικού τμήματος, χρησιμοποιήθηκαν στην αναδρομική μελέτη ανίχνευσης των ιών Usutu και Toscana, μαζί με τα αρνητικά δείγματα ENY από Ιανουάριο του 2017 έως και Σεπτέμβριο του 2019 που υπήρχαν αποθηκευμένα στους -80°C.

### **4.2 Δημιουργία βάσης δεδομένων ENY**

Συνολικά, η βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε με τη χρήση της εφαρμογής Microsoft Excel για τα δείγματα από Ιανουάριο του 2017 έως και Ιούνιο του 2019, περιλαμβάνει 526 καταχωρήσεις δειγμάτων. Από αυτά 477 είναι αρνητικά για όσα παθογόνα εξετάστηκαν.

### **4.3 Στοιχίση αλληλουχιών ιϊκών στελεχών με εκκινητές και ιχνηθέτες στην εφαρμογή BioEdit**

Προτού ληφθεί η τελική απόφαση σχετικά με τις μεθόδους real-time RT-PCR που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε η στοιχίση 15 ιϊκών στελεχών Usutu (Εικόνες 10 και 11) και 23 Toscana (Παράρτημα II - Εικόνες 1, 2 και 3), με τους εκκινητές και ιχνηθέτες των αντίστοιχων υποψήφιων μεθόδων. Όσον αφορά στον ιό Usutu, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου που αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα των Nikolay, και συν. (Εικόνα 11), σε σχέση με τη μέθοδο των Jöst, και συν. (Εικόνα 10), είναι ότι σχεδιάστηκε έχοντας ως γνώμονα πολύ μεγαλύτερη ποικιλία ιϊκών στελεχών Usutu, τόσο Ευρωπαϊκών, όσο και Αφρικανικών. Για τον λόγο αυτό, καθώς και γιατί φαινομενικά ήταν η πιο δημοφιλής στον κύκλο των ερευνητικών ομάδων, επιλέχθηκε ως η πιο κατάλληλη για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Η διαδικασία επιλογής για τον ιό Toscana ήταν λίγο πιο περίπλοκη. Όπως προαναφέρθηκε, έχει επιβεβαιωθεί ότι στην Ελλάδα κυκλοφορεί ένα πιο σπάνιο στέλεχος του ιού, το οποίο ανήκει στην γενεαλογία C. Κάτι τέτοιο βέβαια, σε καμία περίπτωση δεν αποκλείει το ενδεχόμενο κυκλοφορίας στελεχών των γενεαλογιών A και B. Ωστόσο, αναζητώντας στη βιβλιογραφία μεθόδους real-time RT-PCR



ανίχνευσης του ιού Toscana, δεν βρέθηκε καμία που να σχεδιάστηκε λαμβάνοντας υπόψη και στελέχη της γενεαλογίας C. Επιπλέον, η απομόνωση και τυποποίηση του στελέχους αυτής της γενεαλογίας στην Ελλάδα το 2012, είχε πραγματοποιηθεί με χρήση γενικευμένης PCR για φλεβοϊούς και επακόλουθη αλληλούχηση των ευρημάτων. Ενδιαφέρον, όμως, ήταν το γεγονός ότι, η ερευνητική ομάδα που για πρώτη φορά απομόνωσε στέλεχος της γενεαλογίας C στην Κροατία το 2008, είχε χρησιμοποιήσει τη μέθοδο των Pérez-Ruiz, και συν. (Παράρτημα 2 - Εικόνα 1), η οποία ήταν ειδική μόνο για τον ιό Toscana. Κατά τα άλλα, στην πλειοψηφία των δημοσιεύσεων που μελετήθηκαν, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την ανίχνευση του ιού ήταν αυτή που σχεδιάστηκε από την ερευνητική ομάδα των Weidmann, και συν. (Παράρτημα 2 - Εικόνα 2). Επίσης, ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου σε σχέση με την μέθοδο των Brisbarre, και συν. (Παράρτημα 2 - Εικόνα 3), είναι πως οι εκκινητές της περικλείουν μια περιοχή του ιϊκού γονιδιώματος όχι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των στελεχών Toscana. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω στοιχεία, αποφασίστηκε ότι αξίζει να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι για την διεξαγωγή των πειραμάτων, αυτές των Pérez-Ruiz και Weidmann, προκειμένου να εξασφαλιστεί η μέγιστη πιθανότητα απομόνωσης κάποιου ιϊκού στελέχους, είτε γενεαλογίας C, είτε A ή B.

Εικόνα 10: Στοίχιση 15 ιϊκών στελεχών Usutu με τους εκκνητές και τον ιχνηθέτη της μεθόδου «Jöst», με χρήση του προγράμματος CLUSTALW, της εφαρμογής BioEdit.

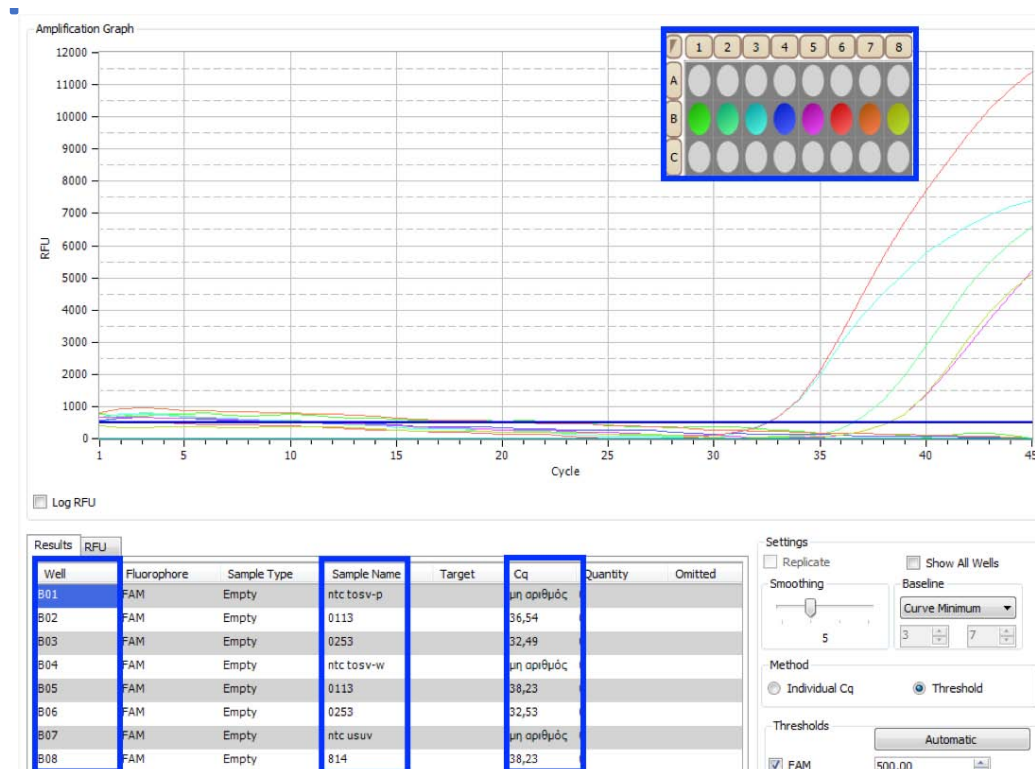
Εικόνα 11: Στοίχιση 15 ιϊκών στελεχών Usutu με τους εκκνητές και τον ιχνηθέτη της μεθόδου «Nikolay», με χρήση του προγράμματος CLUSTALW, της εφαρμογής BioEdit.

#### 4.4 Βελτιστοποίηση των μεθόδων real-time RT-PCR

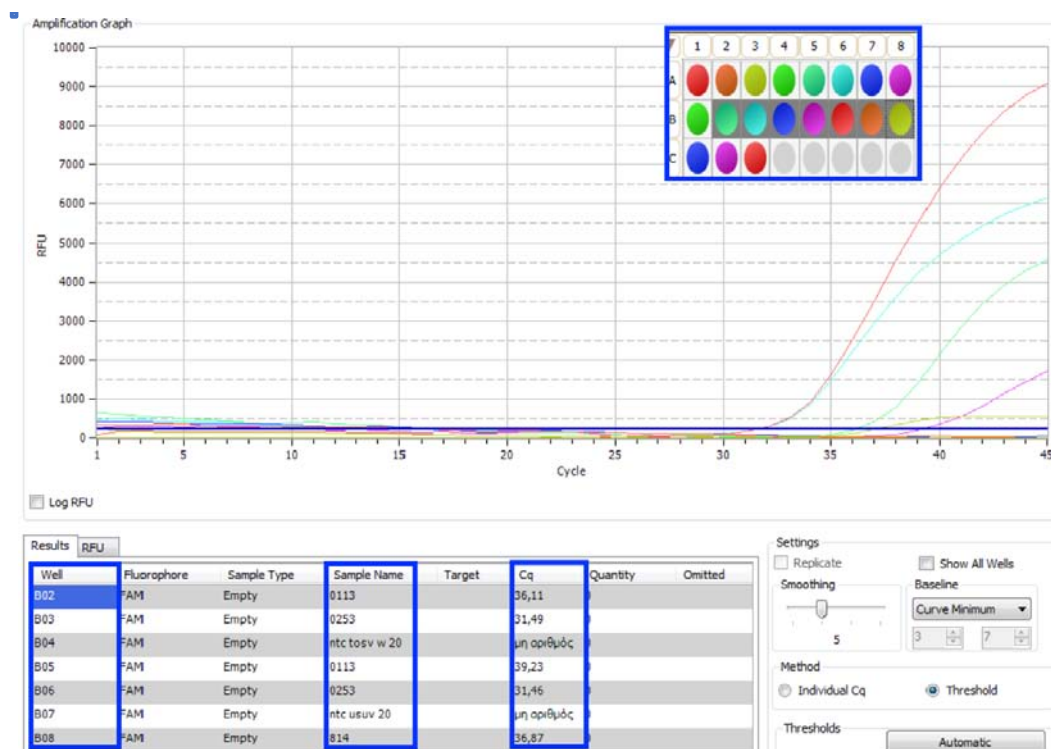
##### 4.4.1 Επιλογή κατάλληλων ενζύμων για την κάθε μέθοδο

Σύμφωνα με τις Εικόνες 13 και 14 φαίνεται ότι, με χρήση του kit της PCRBiosystems, ο θετικός μάρτυρας Usutu (814), παρουσιάζει ικανοποιητικό (σχετικά χαμηλό) Ct αλλά πολύ χαμηλό επίπεδο φθορισμού. Αντίθετα, στην Εικόνα 12 φαίνεται ότι, με τη χρήση του kit της Invitrogen τα επίπεδα φθορισμού είναι πολύ καλύτερα. Επομένως, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας του ιού Usutu σε κλινικά δείγματα ENY επιλέχθηκε το kit SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, της εταιρίας Invitrogen (Cat. No. 11732-020).

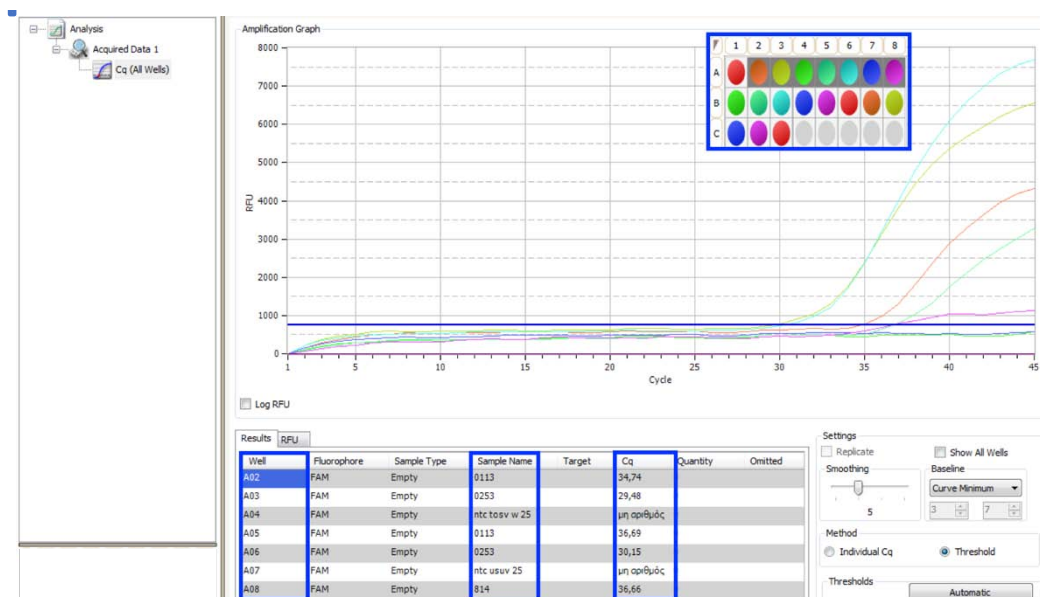
Συνεχίζοντας, σύμφωνα με την Εικόνα 14 φαίνεται ότι, με χρήση του kit της PCRBiosystems και τελικό όγκο αντίδρασης 25 µl, η καμπύλη του θετικού μάρτυρα Toscana (0253) παρουσιάζει υψηλότερο θόρυβο και υψηλότερα Ct σε σχέση, τόσο με τη χρήση του kit της Invitrogen (Εικόνα 12), όσο και με την χρήση του kit της PCRBiosystems με τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl (Εικόνα 13). Επομένως αυτή η επιλογή απορρίπτεται. Συγκρίνοντας τις εναπομείναντες επιλογές (Εικόνες 12 και 13) φαίνεται ότι, και στις δύο, η καμπύλη του θετικού μάρτυρα Toscana (0253) παρουσιάζει χαμηλό θόρυβο και ψηλά επίπεδα φθορισμού. Ωστόσο, τα Ct που καταγράφηκαν με τη χρήση του kit της PCRBiosystems και τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl, ήταν σχετικά χαμηλότερα. Επομένως, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας του ιού Toscana σε κλινικά δείγματα ENY, επιλέχθηκε το kit PCRBIO Probe 1-Step Go NO-Rox, της εταιρίας PCRBiosystems (Cat. No. PB25.43-03) (20 µl). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο, τόσο για την 1<sup>η</sup> (Pérez-Ruiz), όσο και για την 2<sup>η</sup> (Weidmann) μέθοδο ανίχνευσης του ιού.



**Εικόνα 12:** Καμπύλες πολλαπλασιασμού των θετικών μαρτύρων «814» (USUV +) και «0253» (TOSV +) με χρήση του κιτ SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, της εταιρίας Invitrogen (Cat. No. 11732-020), στο μηχάνημα PikoReal24 (Thermo scientific).



**Εικόνα 13:** Καμπύλες πολλαπλασιασμού των θετικών μαρτύρων «814» (USUV +) και «0253» (TOSV +) με χρήση του κιτ PCRBIO Probe 1-Step Go NO-Rox, της εταιρίας PCRBiosystems (Cat. No. PB25.43-03), στο μηχάνημα PikoReal24 (Thermo scientific) και με τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl.



Εικόνα 14: Καμπύλες πολλαπλασιασμού των θετικών μαρτύρων «814» (USUV +) και «0253» (TOSV +) με χρήση του κιτ PCRBIO Probe 1-Step Go NO-Rox, της εταιρίας PCRBiosystems (Cat. No. PB25.43-03), στο μηχάνημα PikoReal24 (Thermo scientific) και με τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl.

#### 4.4.2 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιόντων $Mg^{2+}$ ( $MgSO_4$ )

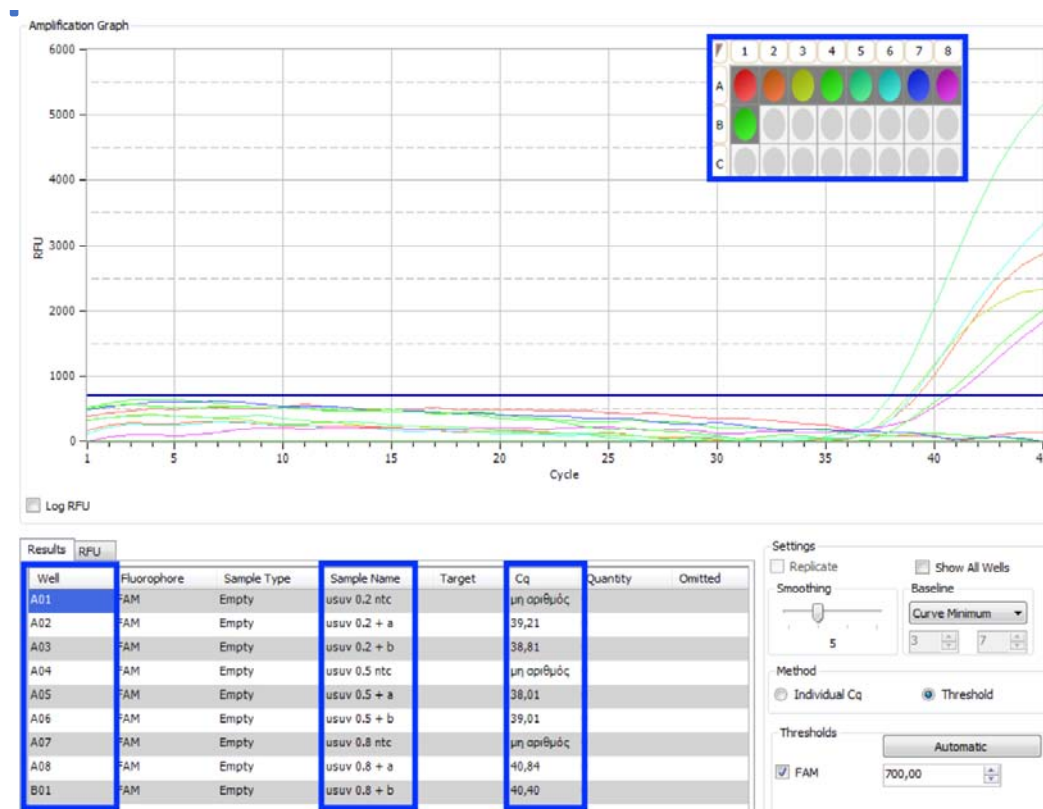
Σύμφωνα με την Εικόνα 15, λόγω καλύτερης επαναληψιμότητας, υψηλότερων επιπέδων φθορισμού και καλύτερων (χαμηλότερων) Ct, η συνολική συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ ) που επιλέγεται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας του ιού Usutu σε κλινικά δείγματα ENY, είναι 4 mM (3 mM προκύπτουν από το ρυθμιστικό διάλυμα 1X Reaction Mix και 1 mM από εξωτερική προσθήκη).



Εικόνα 15: Καμπύλες πολλαπλασιασμού του θετικού μάρτυρα «814» (USUV +) με χρήση μιγμάτων real-time RT-PCR διαφορετικής συγκέντρωσης ιόντων  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ ) (3 mM, 4 mM και 5 mM), στο μηχάνημα PikoReal24 (Thermo scientific).

#### 4.4.3 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών

Σύμφωνα με την Εικόνα 16, λόγω υψηλότερων επιπέδων φθορισμού και καλύτερων (χαμηλότερων) Ct, η συγκέντρωση εκκινητών που επιλέγεται για την διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας του ιού Usutu σε κλινικά δείγματα ENY, είναι 0.5  $\mu M$ .



**Εικόνα 16:** Καμπύλες πολλαπλασιασμού του θετικού μάρτυρα «814» (USUV +) με χρήση μιγμάτων real-time RT-PCR διαφορετικής συγκέντρωσης εκκινητών (0.2  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M και 0.8  $\mu$ M), στο μηχάνημα PikoReal24 (Thermo scientific).

Σύμφωνα με την Εικόνα 17, οι συγκεντρώσεις εκκινητών 0.8  $\mu$ M και 1  $\mu$ M για την 1<sup>η</sup> μέθοδο ανίχνευσης του ιού Toscana (Pérez-Ruiz), και 0.5  $\mu$ M και 0.8  $\mu$ M για την 2<sup>η</sup> μέθοδο (Weidmann), οδηγούν σε εξίσου ικανοποιητικά (χαμηλά) Ct. Λόγω όμως, των πολύ υψηλότερων επιπέδων φθορισμού, καθώς και χάριν οικονομίας αντιδραστηρίων, οι συγκεντρώσεις εκκινητών που επιλέγονται τελικά για την διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας του ιού Toscana σε κλινικά δείγματα ENY, είναι 0.8  $\mu$ M για την 1<sup>η</sup> μέθοδο (Pérez-Ruiz) και 0.5  $\mu$ M για την 2<sup>η</sup> (Weidmann).

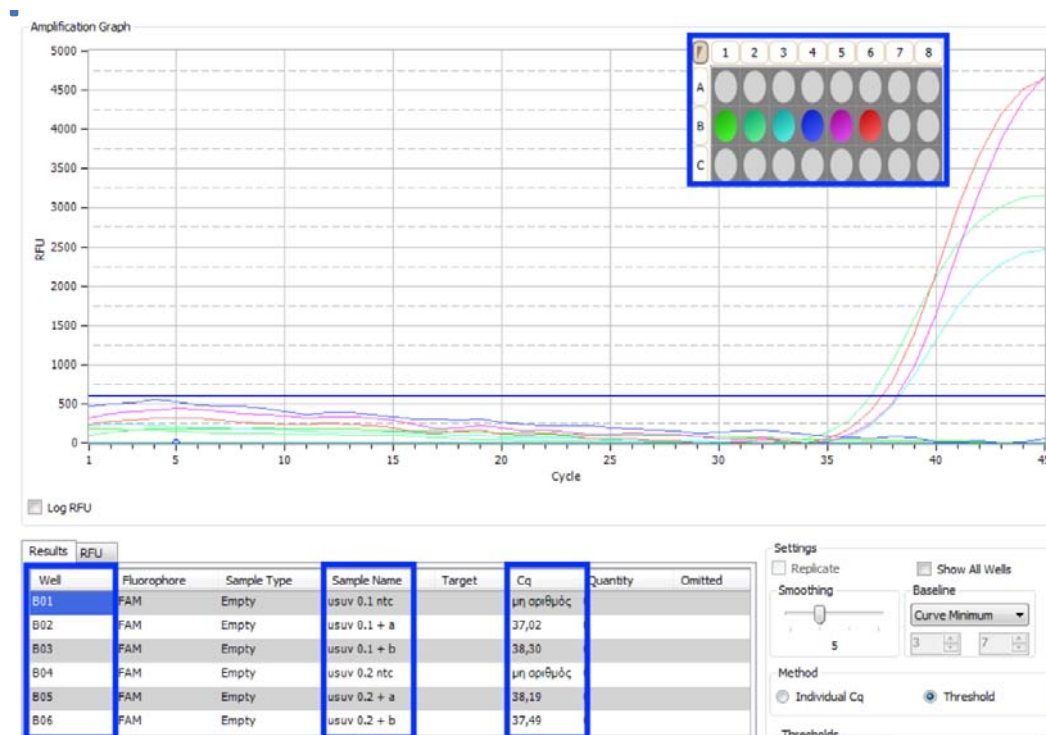


Εικόνα 17: Καμπύλες πολλαπλασιασμού του θετικού μάρτυρα «0253» (TOSV +) με χρήση μιγμάτων real-time RT-PCR διαφορετικής συγκέντρωσης εκκινήτων (0.2  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 0.8  $\mu$ M και 1  $\mu$ M για την 1<sup>η</sup> μέθοδο ανίχνευσης του ιού Toscana) (0.2  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, και 0.8  $\mu$ M για την 2<sup>η</sup> μέθοδο ανίχνευσης του ιού Toscana), στο μηχάνημα PikoReal24 (Thermo scientific).

#### 4.4.4 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιχνηθετών

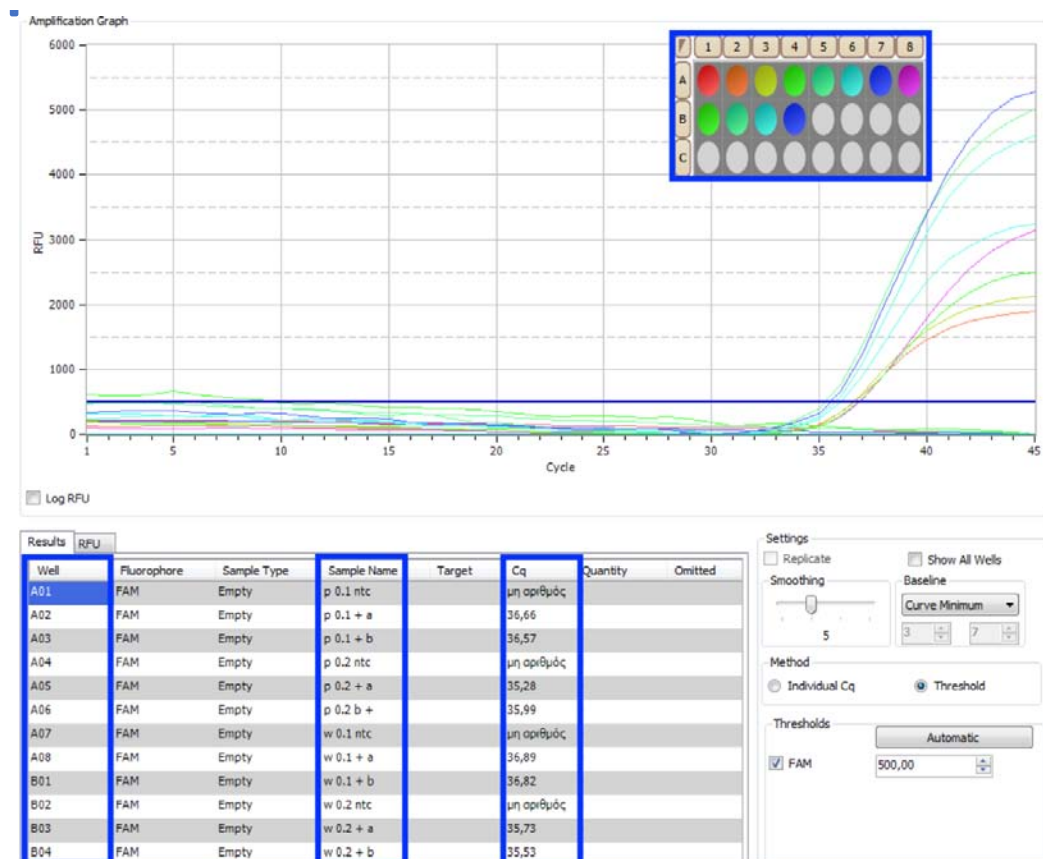
Σύμφωνα με την Εικόνα 18, λόγω υψηλότερων επιπέδων φθορισμού και σχετικά καλύτερων (χαμηλότερων) Ct, η συγκέντρωση ιχνηθέτη που επιλέγεται για την διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας του ιού Usutu σε κλινικά δείγματα ENY, είναι 0.2  $\mu$ M.





**Εικόνα 18:** Καμπύλες πολλαπλασιασμού του θετικού μάρτυρα «814» (USUV +) με χρήση μιγμάτων real-time RT-PCR διαφορετικής συγκέντρωσης ιχνηθετών (0.1  $\mu$ M και 0.2  $\mu$ M), στο μηχανήμα PikoReal24 (Thermo scientific).

Σύμφωνα με την Εικόνα 19, λόγω υψηλότερων επιπέδων φθορισμού και καλύτερων (χαμηλότερων) Ct, οι συγκεντρώσεις ιχνηθετών που επιλέγονται για την διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας του ιού Toscana σε κλινικά δείγματα ENY, είναι 0.2  $\mu$ M, τόσο για την 1<sup>η</sup> μέθοδο ανίχνευσης του ιού (Pérez-Ruiz), όσο και για την 2<sup>η</sup> (Weidmann).



**Εικόνα 19:** Καμπύλες πολλαπλασιασμού του θετικού μάρτυρα «0253» (TOSV +) με χρήση μιγμάτων real-time RT-PCR διαφορετικής συγκέντρωσης ιχνηθετών (0.1  $\mu$ M και 0.2  $\mu$ M, τόσο για την 1<sup>η</sup>, όσο και για τη 2<sup>η</sup> μέθοδο ανίχνευσης του ιού Toscana), στο μηχάνημα PikoReal24 (Thermo scientific).

Συμπερασματικά, εξετάζοντας συνολικά όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αναδρομικής ανίχνευσης της παρουσίας (α) του ιού Usutu σε κλινικά δείγματα ENY, επιλέχθηκε το κιτ SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, της εταιρίας Invitrogen (Cat. No. 11732-020), συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{2+}$  ( $MgSO_4$ ) 4 mM, συγκέντρωση εκκινητών 0.5  $\mu$ M και συγκέντρωση ιχνηθέτη 0.2  $\mu$ M, σε τελικό όγκο αντίδρασης 25  $\mu$ l, (β) του ιού Toscana σε κλινικά δείγματα ENY με την 1<sup>η</sup> μέθοδο (Pérez-Ruiz) ανίχνευσης του ιού, επιλέχθηκε το κιτ PCRBIO Probe 1-Step Go NO-Rox, της εταιρίας PCRBiosystems (Cat. No. PB25.43-03), συγκέντρωση εκκινητών 0.8  $\mu$ M και συγκέντρωση ιχνηθέτη 0.2  $\mu$ M, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20  $\mu$ l και (γ) του ιού Toscana σε κλινικά δείγματα ENY με την 2<sup>η</sup> μέθοδο (Weidmann) ανίχνευσης του ιού, επιλέχθηκε το κιτ PCRBIO Probe 1-Step Go NO-Rox, της εταιρίας PCRBiosystems (Cat. No. PB25.43-03) (20  $\mu$ l), συγκέντρωση εκκινητών 0.5  $\mu$ M και συγκέντρωση ιχνηθέτη 0.2  $\mu$ M, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20  $\mu$ l.

#### 4.5 Έλεγχος ειδικότητας των μεθόδων real-time RT-PCR

Τόσο η μέθοδος ανίχνευσης του ιού Usutu, όσο και οι δύο μέθοδοι ανίχνευσης του ιού Toscana, χαρακτηρίζονται ειδικές καθώς ενισχύουν αποκλειστικά το γονιδιακό τμήμα του ιού για την ανίχνευση του οποίου σχεδιάστηκαν και κανένα άλλο (Πίνακας 1, Παράρτημα II - Εικόνες 4 και 5). Με άλλα λόγια δεν υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με κανέναν από τους επτά θετικούς μάρτυρες διαφορετικών παθογόνων, για τους οποίους πραγματοποιήθηκε έλεγχος.

Αποτελέσματα	Μέθοδος ανίχνευσης Usutu		1 <sup>η</sup> Μέθοδος ανίχνευσης Toscana (Pérez-Ruiz)		2 <sup>η</sup> Μέθοδος ανίχνευσης Toscana (Weidmann)	
	USUV	ΘΕΤΙΚΟ	TOSV	ΘΕΤΙΚΟ	TOSV	ΘΕΤΙΚΟ
	PF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	PF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	PF	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	ChikV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ChikV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ChikV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	DENV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	DENV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	DENV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	ZikV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ZikV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ZikV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	EV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	EV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	EV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	WNV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	WNV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	WNV	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	Measles	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	Measles	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	Measles	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

Πίνακας 1: Ποιοτικά αποτελέσματα των πειραμάτων ειδικότητας των τριών μεθόδων που αναπτύχθηκαν σε αυτήν τη μελέτη.

#### 4.6 Real-time RT-PCR των κλινικών δειγμάτων ENY

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, για τη διεξαγωγή αναδρομικής μελέτης της παρουσίας των αρμποϊών Usutu και Toscana, χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο RNA από τα κλινικά δείγματα ENY που συγκεντρώθηκαν στο Διαγνωστικό Τμήμα του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, από τον Ιανουάριο του 2017 έως και τον Ιούνιο του 2019. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν αρνητικά για όσα παθογόνα εξετάστηκαν στο πλαίσιο λειτουργίας του εργαστηρίου και συγκεκριμένα για Εντεροϊούς, ιό της Ιλαράς, ιό του Έρπητα 1,2,6,7 και 8, ιό του Έρπητα ζωστήρα, ιό Έπσταϊν-Μπαρ, ιό του Δυτικού Νείλου, Παρβοϊό B19, Αδενοϊούς, Κυτταρομεγαλοϊό και Τοξόπλασμα.

Στους Πίνακες 2, 3 και 4 φαίνονται τα αποτελέσματα των δοκιμών real-time RT-PCR των τριών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, υπό τις προαναφερθείσες βελτιστοποιημένες συνθήκες. Δεν εντοπίστηκε κανένα θετικό δείγμα ENY για τους ιούς Usutu και Toscana. Να σημειωθεί ότι στους πίνακες γίνεται

αναφορά στον συνολικό αριθμό ENY που παραλήφθηκαν, στον αριθμό ENY που δεν εξετάστηκαν διότι ήταν θετικά για κάποιο άλλο παθογόνο από αυτά που προαναφέρθηκαν, καθώς και στον αριθμό ENY που τελικά χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα ποιοτικά αποτελέσματα της μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Usutu, διαχωρισμένα ανά έτος παραλαβής των δειγμάτων ENY. Αθροιστικά εξετάστηκαν 477 ENY και δεν εντοπίστηκε κανένα θετικό δείγμα για τον USUV.

Έτος παραλαβής ENY	Σύνολο ENY που παραλήφθηκαν	ENY θετικά για άλλα παθογόνα	ENY που εξετάστηκαν για USUV	Αποτελέσματα Real-time RT-PCR
2017	174	24	150	Όλα αρνητικά
2018	239	23	216	Όλα αρνητικά
2019	113	2	111	Όλα αρνητικά

Πίνακας 2: Ποιοτικά αποτελέσματα της μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Usutu.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ποιοτικά αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> μεθόδου (Pérez-Ruiz) real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana, διαχωρισμένα ανά έτος παραλαβής των δειγμάτων ENY. Αθροιστικά εξετάστηκαν 477 ENY και δεν εντοπίστηκε κανένα θετικό δείγμα για τον TOSV.

Έτος παραλαβής ENY	Σύνολο ENY που παραλήφθηκαν	ENY θετικά για άλλα παθογόνα	ENY που εξετάστηκαν για TOSV-P	Αποτελέσματα Real-time RT-PCR
2017	174	24	150	Όλα αρνητικά
2018	239	23	216	Όλα αρνητικά
2019	113	2	111	Όλα αρνητικά

Πίνακας 3: Ποιοτικά αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> μεθόδου (Pérez-Ruiz) real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana.

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα ποιοτικά αποτελέσματα της 2<sup>ης</sup> μεθόδου (Weidmann) real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana, διαχωρισμένα ανά έτος παραλαβής των δειγμάτων ENY. Αθροιστικά εξετάστηκαν 477 ENY και δεν εντοπίστηκε κανένα θετικό δείγμα για τον TOSV.

Έτος παραλαβής ENY	Σύνολο ENY που παραλήφθηκαν	ENY θετικά για άλλα παθογόνα	ENY που εξετάστηκαν για TOSV-W	Αποτελέσματα Real-time RT-PCR
2017	174	24	150	Όλα αρνητικά
2018	239	23	216	Όλα αρνητικά
2019	113	2	111	Όλα αρνητικά

**Πίνακας 4:** Ποιοτικά αποτελέσματα της 2<sup>ης</sup> μεθόδου (Weidmann) real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana.

**Συμπερασματικά,** συνολικά συγκεντρώθηκαν 526 κλινικά δείγματα ENY και πραγματοποιήθηκε αναδρομικός έλεγχος για την παρουσία των αρμποϊών Usutu και Toscana σε 477 από αυτά, μετά από απομόνωση RNA. Δεν εντοπίστηκε κανένα θετικό δείγμα ENY. Συγκρίνοντας τις καμπύλες των αρχικών δοκιμαστικών πειραμάτων real-time RT-PCR, τόσο της μεθόδου ανίχνευσης του ιού Usutu, όσο και των δύο μεθόδων ανίχνευσης του ιού Toscana, με αυτές που προέκυψαν κατόπιν βελτιστοποίησης, η διαφορά είναι εμφανής. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκαν χαμηλότερα Ct κατά την ανίχνευση των θετικών μαρτύρων, υψηλότερα επίπεδα φθορισμού, καλύτερη γραμμικότητα και μεγαλύτερη ευαισθησία. Συνεπώς, οι δοκιμές βελτιστοποίησης ήταν ιδιαίτερα χρήσιμες για την εξασφάλιση αποτελεσματικότερων μεθόδων ανίχνευσης και σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να παραλείπονται κατά την ανάπτυξη ή εφαρμογή νέων μεθόδων.

## 5. Συζήτηση

Η μελέτη της προέλευσης, της εμφάνισης και της εξάπλωσης ιικών λοιμώξεων στους ανθρώπινους πληθυσμούς είναι ένας από τους πιο δραστήριους και παραγωγικούς τομείς έρευνας στη σύγχρονη εξελικτική βιολογία. Η επιτυχία αυτή οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στον ταχύ ρυθμό με τον οποίο εξελίσσονται οι ιοί, ιδιαίτερα εκείνοι με RNA γονιδιώματα, επιτρέποντας έτσι τη συσσώρευση γενετικών παραλλαγών εντός ενός κατάλληλου επιδημιολογικού χρονικού πλαισίου και συνάμα, προσθέτοντας ισχύ και αξία στις φυλογενετικές αναλύσεις (Holmes *et al.*, 2008).

Οι αρμποϊοί είναι ιοί που χρησιμοποιούν ως κύριους φορείς μετάδοσης τα αρθρώποδα. Ο κατάλογος αρμποϊών του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) ήδη περιλαμβάνει εκατοντάδες ιικά στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες και, ταυτόχρονα, η λίστα νέων αρμποϊών αυξάνεται συνεχώς. Αυτό είναι αποτέλεσμα της εφαρμογής τεχνολογιών αλληλούχησης υψηλής απόδοσης και βελτιωμένων διαδικασιών ιικής απομόνωσης. Αντίστοιχα, τα τελευταία χρόνια, οι αρμποϊκές ασθένειες έχουν επεκτείνει σημαντικά το γεωγραφικό εύρος εμφάνισής τους και μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού βρίσκεται πλέον εκτεθειμένο σε αυτές. Αυτό οφείλεται κυρίως σε παράγοντες που προωθούν την εξάπλωση των αρμποϊών, καθώς και των φορέων τους, αυξάνοντας τον κίνδυνο έκθεσης των ανθρώπων, όπως η παγκοσμιοποίηση του τουρισμού και του εμπορίου, η επέκταση των πόλεων και η αστικοποίηση, η υψηλή πληθυσμιακή πυκνότητα, οι κοινωνικοοικονομικές συνθήκες καθώς και οι κλιματικές αλλαγές (Barzon, 2018).

Οι ιοί Usutu και Toscana ανήκουν στις αρμποϊκές οικογένειες Flaviviridae και Phenuiviridae αντίστοιχα. Παρόλο που η ύπαρξή τους είναι γνωστή εδώ και χρόνια, εξακολουθούν να παραμένουν δύο παραμελημένα ανθρώπινα παθογόνα και δυστυχώς, λίγοι γιατροί έχουν επίγνωση της δυνατότητας των ιών αυτών να προκαλούν λοιμώξεις του ΚΝΣ. Είναι, λοιπόν, απαραίτητο να εμπλουτίζονται συνεχώς οι γνώσεις της επιστημονικής κοινότητας με χρήσιμες και αξιοποιήσιμες πληροφορίες.

Από τις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα, ο ιός Usutu άρχισε να εξαπλώνεται με γρήγορο ρυθμό σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, εκ των οποίων αρκετές πλησίον της Ελλάδας, και σήμερα είναι ενδημικός σε κάποιες από αυτές. Με μοναδική εξαίρεση την ανίχνευση του ιού το 2010 σε ένα περιστέρι στην περιοχή της Βέροιας (Chaintounis *et al.*, 2014), δεν υπάρχουν άλλα δεδομένα για την Ελλάδα, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η εκτίμηση της πραγματικής σημασίας του ιού ως ανθρώπινου παθογόνου παράγοντα για τη χώρα. Η επικρατέστερη θεωρία εξάπλωσης του ιού Usutu από την Αφρική στην Ευρώπη, είναι αυτή που υποστηρίζει ότι συνέβη μέσω της μετανάστευσης αποδημητικών πουλιών. Η Ελλάδα είναι μια χώρα που φιλοξενεί ετησίως πολλά αποδημητικά είδη και κατ' επέκταση μπορεί εν δυνάμει να αποτελέσει σταθμό διάδοσης του ιού, είτε αυτός προέρχεται από τις ενδημικές ευρωπαϊκές χώρες, είτε αν επανεισαχθεί εκ νέου από την Αφρική. Επιπροσθέτως, σε πολλές χώρες της Ευρώπης παρατηρείται συχνά η ταυτόχρονη κυκλοφορία του ιού Usutu με τον ιό του Δυτικού Νείλου, τόσο όσον αφορά στη γεωγραφική περιοχή της μετάδοσής τους, αλλά και όσον αφορά στους φορείς και ξενιστές που εμπλέκονται σε αυτήν (Gaibani & Rossini, 2017). Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι υπεύθυνος για πολλές επιδημίες στην Ελλάδα, τονίζεται η ανάγκη συνεχούς επιτήρησης και διεξαγωγής

επιδημιολογικών μελετών για τον ιό Usutu, προκειμένου να αποφευχθούν αντίστοιχα συμβάντα.

Ο ιός Toscana είναι ενδημικός σε πολλές χώρες της Μεσογείου, μια εκ των οποίων είναι και η Ελλάδα. Μάλιστα, συγκριτικά με άλλες περιοχές, τα ποσοστά οροθετικότητας του Ελληνικού πληθυσμού για τον ιό είναι ιδιαίτερα υψηλά, αγγίζοντας σε κάποιες περιοχές το 60% (Papa *et al.*, 2015 (α)). Σύμφωνα με ορολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε νησιά του Ιονίου, του Αιγαίου και σε πόλεις της βορείου Ελλάδας, η μέση οροθετικότητα είναι 47,7%, 21% και 11,26% αντίστοιχα (Papa *et al.*, 2010; Anagnostou & Papa, 2013 (α); Anagnostou & Papa, 2013 (β)). Σε αντίθεση με τον ιό Usutu, υπάρχουν τέσσερα επιβεβαιωμένα περιστατικά ανθρώπινης ιικής λοίμωξης από τον ιό Toscana στην Ελλάδα, με έντονη συμπτωματολογία. Τα δεδομένα αυτά αιτιολογούν εν μέρει τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς είναι σπάνιος ο εντοπισμός θετικών ENY για τον ιό Toscana. Στην κατεύθυνση αυτή συνηγορεί και το δεδομένο ότι ο ιός Toscana είναι ανιχνεύσιμος στο ENY μόνο τις πρώτες 2-4 ημέρες προσβολής του ΚΝΣ. Σίγουρα, η συλλογή επιπλέον ορολογικών και μοριακών δεδομένων θα βοηθήσουν πολύ στην εξακρίβωση της κυκλοφορίας και της μετάδοσης του ιού στη χώρα μας, τόσο στις επαρχιακές πόλεις, όσο και στα μεγαλύτερα αστικά κέντρα, όπως η Αθήνα και οι γύρω περιοχές της Αττικής.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι, οι λοιμώξεις από USUV και TOSV, αν και μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές νευρολογικές διαταραχές, στην πλειοψηφία τους είναι ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν σχετικά ελαφριά και κοινότυπη συμπτωματολογία, μη ικανή να οδηγήσει ένα ασθενή σε νοσηλεία και κατ' επέκταση σε λήψη κλινικού δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) προς έλεγχο. Αυτό υποδηλώνει ότι, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα πολλά περιστατικά μόλυνσης να μένουν ανεξιχνίαστα και έτσι, η πραγματική εικόνα διάδοσης των ιών στην Ελλάδα να είναι διαφορετική. Ειδικά στην περίπτωση του ιού Toscana, αυτό είναι μια πολύ βάσιμη υπόθεση καθώς θα εξηγούσε τα υψηλά ποσοστά οροθετικότητας που εντοπίζονται στη χώρα.

Λαμβάνοντας υπόψη τη «σπανιότητα» των κλινικών δειγμάτων ENY, σε σύγκριση με πολύ πιο κοινά κλινικά δείγματα τα οποία ελέγχονται για την παρουσία παθογόνων παραγόντων στο πλαίσιο της διάγνωσης, όπως είναι το αίμα, ο ορός και τα ούρα, ο αριθμός δειγμάτων ENY που συλλέχθηκε και εξετάστηκε σε αυτή τη μελέτη ήταν αρκετά μεγάλος. Ακόμη, η βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε για όλα τα δείγματα ENY περιλαμβάνει μεγάλο εύρος στοιχείων και πληροφοριών για το καθένα. Αυτό είναι κάτι που θα φανεί χρήσιμο, τόσο για την συνέχεια και ολοκλήρωση της συγκεκριμένης επιδημιολογικής μελέτης, όσο και για μελλοντικές μελέτες που θα

πραγματοποιηθούν από ερευνητές του Τμήματος Δημόσιας Υγείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, πάνω σε κλινικά δείγματα ENY.

Στο πλαίσιο της βιβλιογραφικής ανασκόπησης που πραγματοποιήθηκε με στόχο την αναζήτηση των βέλτιστων και δημοφιλέστερων μεθόδων real-time RT-PCR για την ανίχνευση των ιών Usutu και Toscana, διαπιστώθηκε ότι οι υπάρχουσες μέθοδοι που ανιχνεύουν αποκλειστικά έναν από τους δύο ιούς, είναι πολύ λίγες. Στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούνται γενικευμένες μέθοδοι, που ανιχνεύουν στελέχη του γένους Flavivirus και Phlebovirus αντίστοιχα, χωρίς να ακολουθεί πάντα τυποποίηση με αλληλούχηση των ευρημάτων. Όσον αφορά στον ιό Usutu, η διαδικασία επιλογής της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ήταν εύκολη και ξεκάθαρη. Αντιθέτως, εφόσον αναζητώντας στη βιβλιογραφία μεθόδους ανίχνευσης real-time RT-PCR του ιού Toscana δεν βρέθηκε καμία που να σχεδιάστηκε λαμβάνοντας υπόψη και στελέχη της γενεαλογίας C, μιας γενεαλογίας που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την Ελλάδα, η διαδικασία επιλογής έγινε πιο περίπλοκη. Αυτό καθώς δεν μπορούσε να γίνει επιλογή αποκλειστικά βάσει των αποτελεσμάτων των στοιχίσεων και των βιβλιογραφικών δεδομένων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το πρόβλημα αυτό θα λυνόταν εάν υπήρχαν περισσότερες πληροφορίες για την αλληλουχία ιικών στελεχών της γενεαλογίας C στις βάσεις δεδομένων, γεγονός που τονίζει ιδιαίτερα την ανάγκη απομόνωσης και τυποποίησης όσο το δυνατόν περισσότερων νέων στελεχών Toscana.

Παρόλο που ο αριθμός των κλινικών δειγμάτων ENY (477) τα οποία εξετάστηκαν για την παρουσία των δύο αρμποιών ήταν αρκετά υψηλός, δεν εντοπίστηκε κάποιο θετικό δείγμα ανάμεσά τους. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι, το γεωγραφικό εύρος προέλευσης των δειγμάτων ήταν σχετικά περιορισμένο, με αξιόλογο αριθμό δειγμάτων να προέρχονται από την περιοχή του Νομού Αττικής. Αν και φαίνεται ότι οι ιοί Usutu και Toscana δεν αποτελούν άμεσο κίνδυνο για τους κατοίκους του αστικού περιβάλλοντος της Αθήνας και των γύρω περιοχών, εφόσον δεν έχει διεξαχθεί κάποια ορολογική μελέτη στην ευρύτερη περιοχή της Αττικής, τα δεδομένα δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα και δεν μπορεί να βγει ένα ξεκάθαρο και ασφαλές συμπέρασμα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, η καλλιέργεια του στελέχους Usutu SAAR-1776 στην καρκινική σειρά C6/36 και η καλλιέργεια του στελέχους Toscana 2016/FR/6371 στην καρκινική σειρά Vero, πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία στις αντίστοιχες καλλιεργητικές συνθήκες που προαναφέρθηκαν, έως ότου επιτεύχθηκε η επιθυμητή συγκέντρωση του εκάστοτε ιού. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητική κυτταροπαθητική δράση και από τους δύο ιούς (CPE, Cytopathic Effect), με εντονότερα αποτελέσματα για το στέλεχος Toscana 2016/FR/6371. Σε περίπτωση, λοιπόν, που στο πλαίσιο διεξαγωγής



μελλοντικών διαγνωστικών εξετάσεων από το Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας βρεθούν κάποια θετικά δείγματα, θα είναι εύκολη η καλλιέργεια και απομόνωση των ιών. Κατόπιν, θα είναι δυνατή η αλληλούχηση και η τυποποίηση των ευρημάτων, κάτι που στην περίπτωση του ιού Toscana έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον πιθανό εντοπισμό στελεχών της γενεαλογίας C.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να γίνει μια σύντομη ανάλυση, καθώς και σύγκριση, ορισμένων οικονομικών στοιχείων, τα οποία αφορούν στις διαφορετικές επιλογές ενός διαγνωστικού εργαστηρίου κατά την ένταξη μιας νέας εξέτασης στο πλαίσιο της ρουτίνας λειτουργίας του. Εν γένει, ένα διαγνωστικό εργαστήριο μπορεί να προμηθευτεί δύο ειδών κιτ που υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο, είτε RUO κιτ (Research Use Only), είτε IVD κιτ (In Vitro Diagnostic). Η διαφορά μεταξύ τους είναι ότι τα RUO κιτ έχουν προδιαγραφές χρήσης μόνο για ερευνητικούς σκοπούς, ενώ στα IVD κιτ έχουν πραγματοποιηθεί ειδικοί ποιοτικοί έλεγχοι ώστε να καλύπτουν τις προδιαγραφές χρήσης για διαγνωστικούς σκοπούς. Όσον αφορά στους ιούς Usutu και Toscana, υπάρχουν ελάχιστες διαθέσιμες επιλογές εμπορικών real-time RT-PCR κιτ και, ενδεικτικά, το κόστος για τον διαγνωστικό έλεγχο ενός δείγματος με χρήση κάποιου από αυτά, σε συνδυασμό με αρνητικό και θετικό μάρτυρα, ανέρχεται περίπου στα 72 €. Για τα διαγνωστικά εργαστήρια που διαθέτουν τις κατάλληλες υποδομές, υπάρχει η επιλογή του σχεδιασμού και ανάπτυξης μιας in house διαγνωστικής μεθόδου real-time RT-PCR, όπως και έγινε στην παρούσα ερευνητική εργασία. Στο πλαίσιο αυτό, βελτιστοποιείται η in house μέθοδος και ελέγχονται παράμετροι όπως, η γραμμικότητα, η ειδικότητα, η ευαισθησία, το εύρος και το όριο ανίχνευσης, καθώς και διενεργούνται εξωτερικοί ποιοτικοί έλεγχοι προκειμένου να πιστοποιηθεί η δυνατότητα χρήσης της ως διαγνωστικής μεθόδου. Το αντίστοιχο κόστος για τον διαγνωστικό έλεγχο ενός δείγματος με χρήση των in house μεθόδων ανέρχεται περίπου στα 12 €, δηλαδή 60 € λιγότερο συγκριτικά με τα εμπορικά κιτ. Φυσικά, προκειμένου να στηθεί μια τέτοια μέθοδος, υπάρχει το επιπλέον αρχικό κόστος για τη διεξαγωγή των δοκιμών και των πειραμάτων βελτιστοποίησης, το οποίο όμως, σε βάθος χρόνου, θα αποσβεστεί από τα έσοδα των διαγνωστικών αναλύσεων του εργαστηρίου. Αντιθέτως, λαμβάνοντας υπόψη τη σπανιότητα και τη χαμηλή ζήτηση της ανίχνευσης των ιών Usutu και Toscana, το κόστος ενός εμπορικού κιτ με ορισμένη ημερομηνία λήξης, κατά πάσα πιθανότητα δεν θα μπορέσει να αποσβεστεί. Αξιολογώντας όλα τα παραπάνω στοιχεία, φαίνεται ότι, στην περίπτωση αυτή, η ανάπτυξη και χρήση in house διαγνωστικών μεθόδων είναι πιο συμφέρουσα για το διαγνωστικό εργαστήριο.

Δεδομένου ότι στο συγκεκριμένο Διαγνωστικό Τμήμα παραλαμβάνεται συστηματικά μεγάλος αριθμός κλινικών δειγμάτων ENY προς έλεγχο για διάφορα παθογόνα, η μελέτη για την ανίχνευση της παρουσίας των ιών Usutu και Toscana

αξίζει να συνεχιστεί. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι τα δείγματα των θερινών μηνών (Μάιο - Οκτώβριο), καθώς όλα τα υπάρχοντα επιδημιολογικά δεδομένα συμφωνούν στην εποχικότητα της διάδοσης των δύο αυτών αρμποιών. Επίσης, καθώς οι πληθυσμοί που ζουν σε αγροτικές περιοχές, με υψηλά επίπεδα υπαίθριων δραστηριοτήτων, διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο σε σχέση με τους κατοίκους μεγάλων πόλεων, θα ήταν χρήσιμο να ελεγχθούν και δείγματα από επαρχιακές πόλεις. Έτσι, θα αυξηθούν οι πιθανότητες απομόνωσης ιικών στελεχών USUV και TOSV και παράλληλα, μέσω αλληλουχήσεων και φυλογενετικών αναλύσεων, θα μπορέσουν να προσδιοριστούν καλύτερα οι διακριτοί πληθυσμοί που κυκλοφορούν στη χώρα και να βελτιωθούν περαιτέρω οι μέθοδοι διάγνωσης. Συνάμα, με την συντήρηση και την προσθήκη νέων καταχωρήσεων στη βάση δεδομένων ENY, θα υπάρχει διαθέσιμη μια πλήρης επιδημιολογική εικόνα για όλα τα δείγματα που έχουν ελεγχθεί και πρόκειται να ελεγχθούν, η οποία μπορεί ανά πάσα στιγμή να αξιοποιηθεί.

Κλείνοντας, όπως έχει προαναφερθεί, ανάλογα με την αιτιολογία, μπορεί να εμφανιστούν διάφορες επιπλοκές όταν μια αρμποιϊκή ασθένεια εκτείνεται πέρα από το στάδιο του απλού πυρετού. Ακόμη, επειδή προς το παρόν δεν υπάρχουν συγκεκριμένες αποτελεσματικές αντιϊκές θεραπείες για οποιονδήποτε από τους γνωστούς αρμποιούς, η έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας με εφαρμογή ευαίσθητων μοριακών μεθόδων καθιστά δυνατή την προσαρμογή της υποστηρικτικής φροντίδας για την αποφυγή μιας ποικιλίας επιπλοκών, αυξάνοντας έτσι σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης του εκάστοτε ασθενούς (Cleton *et al.*, 2012). Σε αυτή την κατεύθυνση διεξήχθη και η παρούσα εργασία που περιέλαβε μια επιτυχημένη προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών μοριακής διάγνωσης της ασθένειας σε ENY. Καλό θα ήταν, λοιπόν, να επενδύονται διαρκώς χρήματα και χρόνος στην ανάπτυξη όσο το δυνατόν ταχύτερων μεθόδων διάγνωσης, καθώς και στις έρευνες για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη αποτελεσματικών επιλογών θεραπείας (Tetro, 2017). Παράλληλα, πρέπει να δίνεται βάση και στις προσπάθειες συνεργασίας και δικτύωσης μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών, καθώς τέτοιου είδους συνεργασίες/δικτυώσεις είναι καθοριστικής σημασίας για την εναρμόνιση των διαγνωστικών πρωτοκόλλων και τη βελτίωση της εργαστηριακής ικανότητας και ετοιμότητας έναντι αναδυόμενων ιών (Barzon, 2018).

## 6. Βιβλιογραφία

- Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., & Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral research*, 100(1), 54-74.
- Anagnostou, V., & Papa, A. (2013). Seroprevalence of Toscana virus among residents of Aegean Sea islands, Greece. *Travel medicine and infectious disease*, 11(2), 98-102. (α)
- Anagnostou, V., & Papa, A. (2013). Prevalence of antibodies to phleboviruses within the sand fly fever Naples virus species in humans, northern Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6), 566-570. (β)
- Ashraf, U., Ye, J., Ruan, X., Wan, S., Zhu, B., & Cao, S. (2015). Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses*, 7(1), 219-238.
- Barrett, A. D., & Teuwen, D. E. (2009). Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?. *Current opinion in immunology*, 21(3), 308-313.
- Barzon, L. (2018). Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *Journal of Clinical Virology*.
- Braack, L., de Almeida, A. P. G., Cornel, A. J., Swanepoel, R., & De Jager, C. (2018). Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasites & vectors*, 11(1), 29.
- Brisbarre, N., Plumet, S., Cotteaux-Lautard, C., Emonet, S. F., Pages, F., & Leparac-Goffart, I. (2015). A rapid and specific real time RT-PCR assay for diagnosis of Toscana virus infection. *Journal of Clinical Virology*, 66, 107-111.
- Cadar, D., Maier, P., Müller, S., Kress, J., Chudy, M., Bialonski, A., ... & Runkel, S. (2017). Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Eurosurveillance*, 22(14).
- Calzolari, M., Gaibani, P., Bellini, R., Defilippo, F., Pierro, A., Albieri, A., ... & Tamba, M. (2012). Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS One*, 7(5), e38058.
- Carr, N. G., & Kelly, D. P. (1984). The microbe 1984: Thirty-sixth Symposium of the Society for General Microbiology, held at the University of Warwick, April 1984. Society for General Microbiology.

- Chaintoutis, S. C., Dovas, C. I., Papanastassopoulou, M., Gewehr, S., Danis, K., Beck, C., ... & Mourelatos, S. (2014). Evaluation of a West Nile virus surveillance and early warning system in Greece, based on domestic pigeons. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 37(2), 131-141.
- Charrel, R. N., Gallian, P., Navarro-Marí, J. M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M. P., ... & De Lamballerie, X. (2005). Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging infectious diseases*, 11(11), 1657.
- Charrel, R. N., Bichaud, L., & de Lamballerie, X. (2012). Emergence of Toscana virus in the mediterranean area. *World journal of virology*, 1(5), 135.
- Charrel, R. N., Berenger, J. M., Laroche, M., Ayhan, N., Bitam, I., Delaunay, P., & Parola, P. (2018). Neglected vector-borne bacterial diseases and arboviruses in the Mediterranean area. *New microbes and new infections*, 26, S31-S36.
- Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G. J., & Reusken, C. (2012). Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 191-203.
- Collao, X., Palacios, G., Sanbonmatsu-Gámez, S., Pérez-Ruiz, M., Negredo, A. I., Navarro-Marí, J. M., ... & Sánchez-Seco, M. P. (2009). Genetic diversity of Toscana virus. *Emerging infectious diseases*, 15(4), 574.
- Collier, L. B., & A Sussman, M. (1998). Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections, Vol 3-Bacterial infections.
- Cook, S., & Holmes, E. C. (2006). A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Archives of virology*, 151(2), 309-325.
- Dimmock, N. J., Easton, A. J., & Leppard, K. N. (2016). *Introduction to modern virology*. John Wiley & Sons.
- Dobler, G., Treib, J., Haass, A., Frösner, G., Woesner, R., & Schimrigk, K. (1997). Toscana virus infection in German travellers returning from the Mediterranean. *Infection*, 25(5), 325-325.
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular detection and quantification*, 12, 1-6.
- Fenner, F. (2008). History of Virology: Vertebrate Viruses.
- Frierson, J. G. (2010). The yellow fever vaccine: a history. *The Yale journal of biology and medicine*, 83(2), 77.

- Gaibani, P., & Rossini, G. (2017). An overview of Usutu virus. *Microbes and infection*, 19(7-8), 382-387.
- Glynn, I., & Glynn, J. (2004). *The life and death of smallpox*. Cambridge University Press.
- Gross, C. P., & Sepkowitz, K. A. (1998). The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *International journal of infectious diseases*, 3(1), 54-60.
- Grottola, A., Marcacci, M., Tagliazucchi, S., Gennari, W., Di Gennaro, A., Orsini, M., ... & Rumpianesi, F. (2017). Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(1), 33-37.
- Holmes, E. C. (2008). Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, 307-328.
- Jöst, H., Bialonski, A., Maus, D., Sambri, V., Eiden, M., Groschup, M. H., ... & Schmidt-Chanasit, J. (2011). Isolation of Usutu virus in Germany. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(3), 551-553.
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108.
- Mouchtouri, V., Papagiannis, D., Katsioulis, A., Rachiotis, G., Dafopoulos, K., & Hadjichristodoulou, C. (2017). Knowledge, attitudes, and practices about the prevention of mosquito bites and Zika virus disease in pregnant women in Greece. *International journal of environmental research and public health*, 14(4), 367.
- Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B., & Sall, A. A. (2011). Usutu virus in Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(11), 1417-1423.
- Oldstone, M. B. (2009). *Viruses, plagues, and history: past, present and future*. Oxford University Press.
- Papa, A., Andriotis, V., & Tzilianos, M. (2010). Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of two Ionian islands, Greece. *Travel medicine and infectious disease*, 8(5), 302-304.
- Papa, A., Mallias, J., Tsergouli, K., Markou, F., Poulou, A., & Milidis, T. (2014). Neuroinvasive phlebovirus infection in Greece: a case report. *Intervirology*, 57(6), 393-395. (α)
- Papa, A., Paraforou, T., Papakonstantinou, I., Pagdatoglou, K., Kontana, A., & Koukoubani, T. (2014). Severe encephalitis caused by Toscana virus, Greece. *Emerging infectious diseases*, 20(8), 1417. (β)

- Papa, A., Kontana, A., & Tsergouli, K. (2015). Phlebovirus infections in Greece. *Journal of medical virology*, 87(7), 1072-1076. (α)
- Papa, A., Kesisidou, C., Kontana, A., Arapidou, Z., & Petropoulou, D. (2015). Phlebovirus infection in Greece: a case report. *Hippokratia*, 19(2), 189. (β)
- Papa, A., & Papadopoulou, E. (2018). Acute viral infections of the central nervous system, 2014-2016, Greece. *Journal of medical virology*, 90(4), 644-647.
- Pérez-Ruiz, M., Collao, X., Navarro-Marí, J. M., & Tenorio, A. (2007). Reversetranscription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *Journal of clinical virology*, 39(4), 276-281.
- Petersen, L. R., Brault, A. C., & Nasci, R. S. (2013). West Nile virus: review of the literature. *Jama*, 310(3), 308-315.
- Pierro, A., Ficarelli, S., Ayhan, N., Morini, S., Raumer, L., Bartoletti, M., ... & Vocale, C. (2017). Characterization of antibody response in neuroinvasive infection caused by Toscana virus. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(11), 868-873.
- Schmidt, N. J., Dennis, J. U. A. N. I. T. A., & Lennette, E. H. (1976). Plaque reduction neutralization test for human cytomegalovirus based upon enhanced uptake of neutral red by virus-infected cells. *Journal of clinical microbiology*, 4(1), 61-66.
- Shors, T. (2016). *Understanding viruses*. Jones & Bartlett Publishers.
- Stratagene. (2010). *Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide*.
- Tetro, J. A. (2017). Is Usutu virus ready for prime time?.
- Valassina, M., Cusi, M. G., & Valensin, P. E. (2003). A Mediterranean arbovirus: the Toscana virus. *Journal of neurovirology*, 9(6), 577-583.
- Vazquez, A., Jiménez-Clavero, M. A., Franco, L., Donoso-Mantke, O., Sambri, V., Niedrig, M., ... & Tenorio, A. (2011). Usutu virus—potential risk of human disease in Europe. *Eurosurveillance*, 16(31), 19935.
- Veater, J., Mehedi, F., Cheung, C. K., Nabarro, L., Osborne, J., Wong, N., ... & Tang, J. W. (2017). Toscana virus meningo-encephalitis: an important differential diagnosis for elderly travellers returning from Mediterranean countries. *BMC geriatrics*, 17(1), 193.
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A., & Actor, J. K. (2017). *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*. Elsevier.

- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85(2), 328-345.
- Weidmann, M., Sanchez-Seco, M. P., Sall, A. A., Ly, P. O., Thiongane, Y., Lô, M. M., ... & Hufert, F. T. (2008). Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *Journal of Clinical Virology*, 41(2), 138-142.
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B., & Nowotny, N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging infectious diseases*, 8(7), 652.
- Wilson, G. S., & Miles, A. A. (1975). *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity* (Vol. 2, No. 6th edition).
- Πλαγεράς, Π., Γεροβασίλη, Α., & Παπαϊωάννου, Α. (2012). *Εφαρμογές Μοριακής Διαγνωστικής*, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- [www.keelpno.gr](http://www.keelpno.gr) (Τελευταία επίσκεψη 23/5/2019)

## **Παράρτημα Ι: Πειραματικά πρωτόκολλα**

### **Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA από κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)**

Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση ολικού RNA είναι η εξής:

- Σε ένα σωληνάκι Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml, προστίθενται 560 µl ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης AVL και 5.6 µl carrier RNA-AVE. Το carrier RNA προστίθεται για να ενισχύσει τη δέσμευση του ιϊκού RNA στη μεμβράνη QIAamp, ειδικά στην περίπτωση δειγμάτων χαμηλού ιϊκού φορτίου, και για να περιορίσει την πιθανή αποικοδόμηση του ιϊκού RNA λόγω κάποιας υπολειπόμενης δραστηριότητας RNase.
- Στο σωληνάκι με το ρυθμιστικό διάλυμα AVL και το carrier RNA-AVE, προστίθενται 140 µl δείγματος ENY και πραγματοποιείται καλή ανάδευση με vortex.
- Το διάλυμα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την επώαση, πραγματοποιείται σύντομη φυγοκέντρηση (spindown) για να απομακρυνθούν τυχόν σταγονίδια από το καπάκι.
- Στο ίδιο σωληνάκι, προστίθενται 560 µl αιθανόλης (96-100%) και πραγματοποιείται καλή ανάδευση με vortex. Μετά την ανάδευση, πραγματοποιείται ξανά σύντομη φυγοκέντρηση (spindown) για να απομακρυνθούν τυχόν σταγονίδια από το καπάκι.
- Με προσοχή, μεταφέρονται 630 µl από το διάλυμα του προηγούμενου βήματος σε μια στήλη QIAamp Mini spin που είναι τοποθετημένη μέσα σε ένα σωληνάκι συλλογής χωρητικότητας 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό. Απομακρύνεται το υγρό που πέρασε από τη στήλη μαζί με το σωληνάκι συλλογής και τοποθετείται νέο.
- Με προσοχή, επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα και για τα υπόλοιπα 630 µl του διαλύματος, όμως η φυγοκέντρηση διαρκεί 1.5 λεπτά.
- Ακολούθως, στη στήλη προστίθενται 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης AW1 και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό. Απομακρύνεται το υγρό που πέρασε από τη στήλη μαζί με το σωληνάκι συλλογής και τοποθετείται νέο.
- Έπειτα, προστίθενται 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης AW2 στη στήλη και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13200 rpm για 3 λεπτά.



- Αφού απομακρυνθεί το υγρό που πέρασε από τη στήλη μαζί με το σωληνάκι συλλογής, τοποθετείται νέο σωληνάκι και γίνεται φυγοκέντρηση στις 13200 rpm για 1.5 λεπτό, για να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης.
- Μετά, η στήλη μεταφέρεται σε ένα σωληνάκι Eppendorf και προστίθενται σε αυτή 70 µl AVE. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το AVE είναι νερό χωρίς RNases που περιέχει 0.04% αζίδιο του νατρίου για την πρόληψη μικροβιακής ανάπτυξης και την πιθανή εκ νέου μόλυνση με RNases.
- Μετά την επώαση, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1.5 λεπτό και το RNA του δείγματος ENY εκλούεται στο σωληνάκι Eppendorf.

### **Τελικά πρωτόκολλα των μεθόδων real-time RT-PCR**

#### **Πρωτόκολλο μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Usutu**

Η real-time RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 µl και περιείχε 12.5 µl 2X Reaction Mix (ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0.4mM από κάθε dNTP και 6mM MgSO<sub>4</sub>), 0.5 µl MgSO<sub>4</sub> (50mM), 0.625 µl από κάθε εκκινητή (20µM), 0.5 µl ιχνηθέτη (10µM), 0.8 µl SuperScript™ III RT/Platinum® Taq mix (μίγμα ενζύμων αντίστροφης μεταγραφάσης και Taq DNA πολυμεράσης), 0.5 µl ενζύμου RNase OUT (40U/µl), 1.95 µl ddH<sub>2</sub>O και 7 µl δείγμα.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η real-time RT-PCR για την ανίχνευση της παρουσίας του ιού Usutu ήταν οι εξής:

- Αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA στους 50°C για 20 λεπτά
- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 λεπτά
- 45 κύκλοι των 15 δευτερολέπτων αποδιάταξης στους 95°C και 30 δευτερολέπτων υβριδοποίησης και επιμήκυνσης στους 60°C
- Επαναφορά θερμοκρασίας στους 20°C για 10 δευτερόλεπτα

Οι αντιδράσεις real-time RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στα μηχανήματα Lightcycler480 (Roche) and PikoReal24 (Thermo scientific).

#### **Πρωτόκολλο 1<sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana**

Η real-time RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl και περιείχε 10 µl 2X qPCRBIO Probe 1 – Step Go Mix (περιέχει Taq DNA πολυμεράση), 0.8 µl από κάθε εκκινητή (20µM), 0.4 µl ιχνηθέτη (10µM), 1 µl 20X RTase Go (μίγμα ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV), 2 µl ddH<sub>2</sub>O και 5 µl δείγμα.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η real-time RT-PCR για την ανίχνευση της παρουσίας του ιού Toscana ήταν οι εξής:

- Αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA στους 50°C για 20 λεπτά
- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 λεπτά
- 45 κύκλοι των 15 δευτερολέπτων αποδιάταξης στους 95°C και 30 δευτερολέπτων υβριδοποίησης και επιμήκυνσης στους 60°C
- Επαναφορά θερμοκρασίας στους 20°C για 10 δευτερόλεπτα

Οι αντιδράσεις real-time RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στα μηχανήματα Lightcycler480 (Roche) and PikoReal24 (Thermo scientific).

#### Πρωτόκολλο 2<sup>ης</sup> μεθόδου real-time RT-PCR για την ανίχνευση του ιού Toscana

Η real-time RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl και περιείχε 10 µl 2X qPCRBIO Probe 1 – Step Go Mix (περιέχει Taq DNA πολυμεράση), 0.8 µl από κάθε εκκινητή (20µM), 0.4 µl ιχνηθέτη (10µM), 1 µl 20X RTase Go (μίγμα ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV), 2 µl ddH<sub>2</sub>O και 5 µl δείγμα.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η real-time RT-PCR για την ανίχνευση της παρουσίας του ιού Toscana ήταν οι εξής:

- Αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA στους 50°C για 20 λεπτά
- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 λεπτά
- 45 κύκλοι των 15 δευτερολέπτων αποδιάταξης στους 95°C και 30 δευτερολέπτων υβριδοποίησης και επιμήκυνσης στους 60°C
- Επαναφορά θερμοκρασίας στους 20°C για 10 δευτερόλεπτα

Οι αντιδράσεις real-time RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στα μηχανήματα Lightcycler480 (Roche) and PikoReal24 (Thermo scientific).

#### Πρωτόκολλο εμβολιασμού των ιών στις κυτταρικές σειρές

Η διαδικασία του εμβολιασμού των ιών στις κυτταρικές σειρές είναι η ίδια και για τα δύο είδη ιών και είναι η ακόλουθη:

- Απομάκρυνση του καλλιεργητικού μέσου
- Πλύση των κυττάρων με PBS (ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα) και απομάκρυνση του υγρού
- Εμβολιασμός των κυττάρων με 200 µl των αρχικών ιών και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα

- Προσθήκη του αντίστοιχου καλλιεργητικού μέσου και μεταφορά στον κλίβανο επώασης
- Καθημερινή παρακολούθηση των κυττάρων για τον εντοπισμό της κυτταροπαθητικής δράσης των ιών (CPE, Cytopathic Effect), η οποία είναι ενδεικτική της ιϊκής ανάπτυξης

## Παράρτημα II: Αποτελέσματα – Πρόσθετο υλικό

Παράρτημα II-Εικόνα 1:  
Στοίχιση 23 ιϊκών στελεχών  
Toscana με τους εκκινητές και  
τον ιχνηθέτη της μεθόδου  
«Pérez-Ruiz», με χρήση του  
προγράμματος CLUSTALW,  
της εφαρμογής BioEdit.

Παράρτημα II-Εικόνα 2:  
Στοίχιση 23 ιϊκών στελεχών  
Toscana με τους εκκινητές και  
τον ιχνηθέτη της μεθόδου  
«Weidmann», με χρήση του  
προγράμματος CLUSTALW,  
της εφαρμογής BioEdit.

Παράρτημα II-Εικόνα 3:  
Στοίχιση 23 ιϊκών στελεχών  
Toscana με τους εκκινητές και  
τον ιχνηθέτη της μεθόδου  
«Brisbarre», με χρήση του  
προγράμματος CLUSTALW,  
της εφαρμογής BioEdit.

Παράρτημα II-Εικόνα 4:  
Καμπύλες πολλαπλασιασμού  
των θετικών μαρτύρων «814»  
(USUV +), PF, ChikV, DENV,  
ZikV, EV, WNV και Measles, με  
χρήση μίγματος real-time RT-  
PCR ανίχνευσης του ιού Usutu,  
στο μηχάνημα Lightcycler480

Παράρτημα II-Εικόνα 5:  
Καμπύλες πολλαπλασιασμού  
των θετικών μαρτύρων «0253»  
(TOSV +), PF, ChikV, DENV,  
ZikV, EV, WNV και Measles, με  
χρήση μιγμάτων real-time RT-  
PCR σύμφωνα με την 1<sup>η</sup> (Pérez-  
Ruiz) και τη 2<sup>η</sup> μέθοδο  
(Weidmann) ανίχνευσης του ιού  
Toscana αντίστοιχα, στο  
μηχάνημα Lightcycler480  
(Roche).